

SILVANO RODRIGUES BORGES

MICROPROPAGAÇÃO E ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE  
CLONES HÍBRIDOS DE *Eucalyptus globulus*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

SILVANO RODRIGUES BORGES

MICROPROPAGAÇÃO E ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE  
CLONES HÍBRIDOS DE *Eucalyptus globulus*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA EM: 16 de fevereiro de 2009.

---

Prof. Wagner Campos Otoni  
(Co-orientador)

---

Prof. Ismael Eleotério Pires  
(Co-orientador)

---

Prof. José Maria Moreira Dias

---

Pesq. Elizabete Keiko Takahashi

---

Prof. Aloisio Xavier  
(Orientador)

Aos meus pais Antônio e Iolanda pelo amor, incentivo e apoio nesta conquista,  
com muita gratidão.  
Aos meus irmãos Paulo, João, Antonio Carlos, Jesuíno, Roseli e Rosania  
pelo apoio, estímulo e companheirismo.

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida e por iluminar meu caminho.

Aos meus pais, irmãos e cunhados que sempre me apoiaram e incentivaram.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Engenharia Florestal, pela oportunidade concedida para a realização do curso de Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos.

À empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA), por disponibilizar o material genético e pelo financiamento do projeto.

Ao Prof. Dr. Aloisio Xavier, pela orientação, incentivo e amizade, pela constante disponibilidade em todos os momentos, pelo exemplo de profissionalismo, concedendo esta oportunidade para minha formação.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Wagner Campos Otoni, Prof. Dr. Ismael Eleotério Pires, Prof. Dr. José Maria Moreira Dias e a Pesquisadora Dr. Elizabete Keiko Takahashi, por aceitarem prontamente o convite e por contribuírem com este trabalho com sugestões e críticas.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Engenharia Florestal da UFV, pelo aprendizado e apoio.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos, Crislene, Virgílio, Lourdes, Ana Cláudia, Katryne, Lili, Daniela, Ana Paula, Tales, Joseila, Marcelo, Elyabe, Marcos, Iulla, Denise e ao Prof. Wagner, pela agradável convivência durante esses anos e pelas contribuições na realização deste trabalho.

Aos meus estagiários e amigos Leandro e Aline, pela dedicação e zelo na condução dos experimentos.

Aos funcionários do Viveiro de Pesquisas Florestais da UFV, especialmente ao Alex e ao Sr. Sebastião pelo auxílio na condução dos experimentos.

Ao amigos do Grupo de Silvicultura Clonal (GSC), especialmente ao Lucas, Mila, Rogério e Prof. Aloisio, pela amizade e troca de experiências profissionais.

A todos os amigos, dos tempos de graduação, da “República dos Gatos Escaldados, 1511” e os que conheci durante o Mestrado, pelos bons momentos vividos e apoio nos momentos difíceis.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e para minha formação.

Minhas sinceras desculpas a todos que colaboraram nesta etapa da minha vida que não mencionei, por falta de minha memória, e que fazem parte dessa história!

**A todos o meu “Muito Obrigado”**

## **BIOGRAFIA**

SILVANO RODRIGUES BORGES, filho de Antônio Borges e Iolanda Rodrigues Borges, nasceu em 15 de maio de 1983, em Guaçuí, ES.

Em 1998, concluiu o 1º grau na Escola Estadual Antônio Carneiro Ribeiro, em Guaçuí, ES.

Em 2001, concluiu o 2º grau e o curso Técnico em Agropecuária na Escola Agrotécnica Federal de Alegre – EAFA, em Alegre, ES.

Em 2007, diplomou-se em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Em março de 2007, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, em nível de mestrado, na área de concentração em Silvicultura, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2009.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	5
<b>ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE CLONES HÍBRIDOS DE <i>Eucalyptus globulus</i></b> .....	8
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.1. Fontes de explantes.....	10
2.2. Coleta e preparo dos explantes.....	12
2.3. Introdução <i>in vitro</i> .....	13
2.4. Condução e avaliações experimentais.....	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4. CONCLUSÕES.....	22
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
<b>MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE CLONES HÍBRIDOS DE <i>Eucalyptus globulus</i></b> .....	26
RESUMO.....	26
ABSTRACT.....	26
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1. Material experimental.....	29
2.2. Multiplicação <i>in vitro</i> .....	31

2.3. Condução e avaliações experimentais.....	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4. CONCLUSÕES.....	41
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
<b>ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE CLONES HÍBRIDOS DE</b>	
<b><i>Eucalyptus globulus</i></b> .....	45
RESUMO.....	45
ABSTRACT.....	45
1. INTRODUÇÃO.....	46
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1. Material experimental.....	47
2.2. Manejo do minijardim clonal.....	49
2.3. Coleta, preparo e estaqueamento das miniestacas.....	49
2.4. Condução e avaliações experimentais.....	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4. CONCLUSÕES.....	57
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
3. CONCLUSÕES GERAIS.....	60



## RESUMO

BORGES, Silvano Rodrigues, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Micropropagação e enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus***. Orientador: Aloisio Xavier. Co-orientadores: Wagner Campos Otoni e Ismael Eleotério Pires.

O presente estudo teve como objetivos avaliar clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* em relação à micropropagação pela proliferação de gemas axilares nas fases de estabelecimento e multiplicação *in vitro*, e o enraizamento de miniestacas na propagação clonal desses híbridos. Na fase de estabelecimento *in vitro*, foram avaliadas a contaminação por fungos e bactérias, oxidação e a indução de brotações em segmentos nodais de 21 clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e oito clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* em diferentes introduções *in vitro*. Na multiplicação *in vitro*, avaliou-se a taxa de multiplicação de 21 clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e seis clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* em sucessivos subcultivos nos meios de cultura MS e JADS, em diferentes introduções *in vitro*. Na miniestaquia, avaliou-se a sobrevivência e a emissão de raízes no fundo do tubete na casa de vegetação e de sombra, e o enraizamento e número de raízes na casa de sombra de miniestacas apicais e intermediárias, tratadas com AIB, em nove clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e dois clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*. No estabelecimento *in vitro*, a indução de brotações foi variável entre clones, sendo satisfatória para a maioria dos genótipos, enquanto a ocorrência de oxidação e contaminação por bactérias e fungos não comprometeu o estabelecimento das culturas. Na fase de

multiplicação *in vitro*, houve resposta diferenciada quanto à taxa de multiplicação, com clones apresentando boas taxas de multiplicação *in vitro* e outros recalcitrantes à micropropagação. Os meios de cultura MS e JADS tiveram efeitos positivos, com tendência de maiores taxas de multiplicação para o meio MS, sendo que ao longo dos subcultivos a taxa de multiplicação variou com tendência de aumento inicial e posterior queda na maioria dos clones e introduções *in vitro*. Quanto à miniestaquia, não houve efeito significativo do AIB em nenhuma das características estudadas. A sobrevivência das miniestacas foi alta para a maioria dos clones e as taxas de enraizamento variaram entre clones e entre os tipos de miniestacas, com resultados superiores para miniestacas apicais. Foi observado entre os clones estudados alta variabilidade de resposta ao enraizamento, com clones apresentando alto índice de enraizamento e número de raízes por miniestaca, enquanto alguns clones ainda carecem de ajustes no processo de propagação por miniestaquia.

## ABSTRACT

BORGES, Silvano Rodrigues, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2009. **Micropropagation and rooting of mini-cuttings of hybrid clones of *Eucalyptus globulus***. Advisor: Aloisio Xavier. Co-advisors: Wagner Campos Otoni and Ismael Eleotério Pires.

The present study aimed to evaluate *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* and *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* clones in relation to micropropagation by axillary shoot proliferation in the *in vitro* establishment and multiplication phases, and the rooting of mini-cuttings in the clonal propagation of these hybrids. In the *in vitro* establishment phase, contamination by fungi and bacteria, browning and nodal segment shoot inductions of 21 *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* clones and eight *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* clones were evaluated in different *in vitro* introductions. In the *in vitro* multiplication phase, the multiplication rate of 21 *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* clones and six *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* clones was evaluated in successive subcultures using MS and JADS culture media in different *in vitro* introductions. In the mini-cuttings, the survival and emission of roots at the bottom of the dibble tube in the green house and shade house was evaluated, and the rooting and number of roots of apical and intermediary mini-cuttings in the shade house, treated with IBA, in nine *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* clones and two *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* clones. In the *in vitro* establishment phase, shoot induction varied among clones, being satisfactory for most of the genotypes, while the browning rate and bacterial and fungal contamination did not compromise the establishment of the cultures. In the *in vitro* multiplication phase, a

differentiated response for the multiplication rate was noted, with clones presenting good *in vitro* multiplication rates and recalcitrant others for micropropagation. The MS and JADS culture media had positive effects, with greater multiplication rate tendencies for the MS media, where the multiplication rate of the subcultures varied with the tendency of an initial increase and subsequent fall in most of the clones and *in vitro* introductions. As for the mini-cuttings, there was no significant effect of IBA in any of the studied characteristics. The survival rate of the mini-cuttings was high for most of the clones and the rooting rate varied among clones and the types of mini-cuttings with superior results for apical mini-cuttings. A high variability of responses to rooting was observed among the studied clones, with clones presenting a high rate of rooting and number of roots for mini-cuttings, while some clones still lacked adjustments to the mini-cuttings propagation process.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O setor florestal brasileiro ocupa, atualmente, uma posição de destaque no cenário mundial, graças às condições ambientais favoráveis ao crescimento das florestas, principalmente do gênero *Eucalyptus*, bem como aos programas de pesquisa em melhoramento genético e manejo silvicultural que vêm proporcionando ganhos significativos em produtividade e qualidade da madeira de florestas plantadas.

A indústria de papel e celulose, dentre outros segmentos do setor florestal, é a que mais se destaca, colocando o Brasil como o maior produtor mundial de celulose de fibra curta de *Eucalyptus* e, ainda, sendo este um dos principais produtos de exportação do país (ABRAF, 2007). O mercado globalizado e competitivo tem exigido que as empresas do setor busquem, cada vez mais, ganhos em produtividade e qualidade dos seus produtos, aliado à redução dos custos de produção. Neste sentido, a busca por espécies/clones que conciliem desenvolvimento florestal com qualidade da madeira e rendimento no processo de conversão a celulose e papel têm sido constantes nos programas de pesquisa (CARDOSO et al., 2002).

O *Eucalyptus globulus* tem sido amplamente plantado em países como Espanha, Portugal, Chile, Marrocos, China, Uruguai, Argentina e Austrália, com o objetivo de produção de madeira para fins industriais (Mac Rae e Coterril, 1997, citados por DEL PONTE et al., 2001). É uma espécie amplamente cultivada em regiões com inverno chuvoso e temperaturas relativamente baixas (XAVIER et al., 2007a), sendo de difícil adaptabilidade em climas tropicais (ROSA, 2003). No Brasil, os plantios se limitam ao estado do Rio Grande do Sul, devido às condições climáticas favoráveis ao crescimento,

não encontradas nas regiões de clima quente (SHIMIZU, 1986; CARDOSO, 2002).

Na produção de papel e celulose, o *Eucalyptus globulus* é uma espécie de grande interesse por possuir características químicas, físicas e anatômicas de excelente qualidade para tal objetivo, principalmente alto rendimento em celulose e baixo teor de lignina (CARDOSO, 2002; ROSA, 2003; ALFENAS et al., 2004; XAVIER et al., 2007a).

A hibridação de *Eucalyptus globulus* com outras espécies do gênero *Eucalyptus* tem proporcionado excelentes resultados, tanto em qualidade da madeira, quanto em crescimento, além de uma melhor adaptação ambiental e maior facilidade de propagação vegetativa, dentre outras vantagens. Desta forma, a opção por esses híbridos tende a prevalecer sobre seu uso como espécie pura nas regiões tropicais e subtropicais (ALFENAS et al., 2004).

As espécies *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* têm sido as mais amplamente plantadas no Brasil com fins industriais, devido, dentre outras características, a alta taxa de crescimento, qualidade da madeira e adaptação às condições ambientais (MORA e GARCIA, 2000). A hibridação entre essas duas espécies tem-se constituído na base da silvicultura clonal brasileira (RUY, 1998), aliando bom crescimento, característica do *Eucalyptus grandis*, e melhorias na qualidade da madeira e resistência a doenças, característica do *Eucalyptus urophylla* (CARVALHO, 2000). Dessa forma, recentemente essas duas espécies passaram a ser usadas para hibridação com *Eucalyptus globulus* nos programas de melhoramento, visando a produção de celulose e papel no Brasil (ALFENAS et al., 2004).

A silvicultura clonal com *Eucalyptus* constitui uma das mais evoluídas e bem estabelecidas, sendo uma realidade na maioria das empresas florestais brasileiras. Ela permite, dentre outras vantagens, a uniformização dos plantios, maximização dos ganhos em produtividade e qualidade da madeira, melhor adaptação dos clones à área a ser plantada e aproveitamento de combinações híbridas específicas, aliado a racionalização das atividades operacionais e custos competitivos (XAVIER, 2002; ALFENAS et al., 2004; ASSIS et al., 2004).

A clonagem de *Eucalyptus* no Brasil passou por inúmeras transformações, tendo iniciado com a técnica de estaquia implementada em escala comercial no final da década de 70 (XAVIER, 2002). Devido às dificuldades de enraizamento encontradas em algumas espécies e clones de *Eucalyptus* na propagação por estaquia, principalmente no que envolve material adulto (ASSIS, 1997), técnicas de propagação *in vitro* vêm sendo

utilizadas no rejuvenescimento de clones, restaurando, dessa maneira, sua competência ao enraizamento (XAVIER e COMÉRIO, 1996; TITON, 2001).

O aprimoramento no enraizamento de estacas de *Eucalyptus* tem sido alcançado com o desenvolvimento de técnicas como a miniestaquia (XAVIER e WENDLING, 1998; WENDLING et al., 2000; HIGASHI et al., 2000) e a micropropagação, aliada à microestaquia (ASSIS et al., 1992; XAVIER e COMÉRIO, 1996; TITON, 2001), que possibilitaram consideráveis ganhos, principalmente quanto ao aumento das taxas e qualidade de enraizamento e redução do tempo para a formação da muda.

A miniestaquia tem sido largamente utilizada nas empresas do setor florestal brasileiro, devido aos ganhos em porcentagem e qualidade do enraizamento de estacas. Estes ganhos se devem principalmente ao fato de se utilizar estacas apicais mais juvenis e melhor controle das condições hídricas, nutricionais e fitossanitárias das plantas fornecedoras de propágulos (ASSIS et al., 2004).

Na miniestaquia, de modo geral, a aplicação de substâncias reguladoras do enraizamento é feita em doses mais baixas do que na estaquia, não sendo necessária aplicação para clones de fácil enraizamento (XAVIER 2002). No entanto, para clones de difícil enraizamento, a aplicação reguladores de crescimento como o Ácido Indolbutírico (AIB) pode resultar em ganhos significativos de enraizamento das miniestacas (TITON 2001; ASSIS et al., 2004).

Quanto à micropropagação, esta envolve a produção de plantas a partir de órgãos, tecidos ou células, os quais são cultivados assepticamente em meio nutritivo adequado, sob controle das condições ambientais e nutricionais (HARTMANN et al., 2002; GEORGE e DEBERGH, 2008). Sua aplicabilidade está baseada na teoria da totipotência celular, a qual estabelece a qualquer parte do vegetal potencial para regenerar os órgãos que lhe faltam, desde que sejam fornecidas as condições adequadas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

As técnicas de cultivo *in vitro* podem constituir alternativa econômica e adequada em relação aos métodos clássicos de propagação vegetativa de *Eucalyptus*. Isso ocorre, pois, além de oferecerem a possibilidade de propagação de árvores selecionadas de todas as idades (Cresswell e Fossard, 1974, citados por ALVAREZ e RESTREPO, 1993), possibilitam a limpeza clonal (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998), e a alta taxa de multiplicação acelera os programas de propagação clonal, possibilitando a propagação

vegetativa de híbridos de *Eucalyptus* de alto valor comercial e difícil enraizamento pelos métodos convencionais (RATNIEKS e ASSIS, 1993).

As técnicas de micropropagação, de acordo com o explante utilizado e sua subsequente manipulação, são a proliferação de gemas axilares, a indução de gemas adventícias por organogênese e a embriogênese somática (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; XAVIER et al., 2007b; GEORGE e DEBERGH, 2008). No setor florestal, especialmente em *Eucalyptus*, a micropropagação mediante proliferação de gemas axilares tem sido a mais utilizada, sendo mais simples que os outros dois sistemas por se basear na proliferação de gemas pré-formadas, reproduzindo *in vitro* um fenômeno natural (XAVIER et al., 2007b).

A micropropagação pela proliferação de gemas axilares compreende as fases de estabelecimento *in vitro*, multiplicação e alongamento, enraizamento e aclimação *ex vitro* (XAVIER et al., 2007b; GEORGE e DEBERGH, 2008). GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998) descrevem diversas variáveis que afetam as diferentes fases da propagação de plantas *in vitro*, sendo determinantes no sucesso de um sistema de propagação. Dentre elas, podem-se citar as condições fitossanitárias e nutricionais da planta matriz, a seleção e coleta dos explantes, a desinfestação e o isolamento em condições assépticas, os meios de cultura, os reguladores de crescimento, as condições de incubação e a manipulação das culturas. Segundo esses mesmos autores, cada espécie ou clone apresenta características únicas, determinadas por fatores genéticos, e dessa forma, as necessidades para seu cultivo *in vitro* também tendem a apresentar particularidades. A capacidade de morfogênese e crescimento *in vitro* parece estar associada não apenas ao genótipo, mas também à atividade fisiológica na planta matriz.

Nos programas de melhoramento florestal, a seleção de genótipos superiores ocorre basicamente na fase adulta. Assim, a maturação dos tecidos da planta, decorrente da transição da fase juvenil para a adulta, gera uma série de alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas que determinam a resposta do material à propagação vegetativa e, posteriormente, ao crescimento dos povoamentos florestais (HACKETT, 1987). Assim, o rejuvenescimento de clones torna-se importante em virtude de o processo de maturação ser um fenômeno que geralmente afeta espécies lenhosas de acordo com o seu desenvolvimento ontogenético. Uma das mais importantes conseqüências do envelhecimento ontogenético para a clonagem é a redução ou até mesmo a perda da capacidade de enraizamento que se verifica em plantas adultas (GOMES, 1987;



GREENWOOD e HUTCHISON, 1993; LIBBY e AHUJA, 1993). Nesse contexto, a micropropagação de *Eucalyptus* atualmente tem sido utilizada no rejuvenescimento de clones, visando à formação do microjardim clonal, para produção de microestacas no processo de propagação pela microestaquia.

A espécie *Eucalyptus globulus* é reconhecidamente de difícil enraizamento de estacas. Entretanto, a variabilidade genética intraespecífica para crescimento, resistência a doenças e qualidade da madeira é melhor explorada industrialmente, mediante a clonagem de matrizes superiores (ALFENAS et al., 2004). Dessa forma, tem sido incentivado o desenvolvimento de pesquisas sobre espécies recalcitrantes ao enraizamento, especialmente em *E. globulus* e seus híbridos, devido a importância que representam para o setor de celulose e papel, para que sistemas funcionais de propagação clonal possam ser implementados.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivos avaliar a resposta de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* em relação ao estabelecimento e multiplicação *in vitro*, com vistas ao rejuvenescimento clonal, bem como avaliar o enraizamento de miniestacas na propagação clonal desses híbridos.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. 442 p.

ALVAREZ, C. M. C.; RESTREPO, L. M. M. Propagacion “in vitro” de *Eucalyptus grandis*. **Cronica forestal y de medio ambiente**, n. 8, p. 35-42, 1993.

ASSIS, T. F. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA, 1997. v. 1, p. 300-304.

ASSIS, T. F.; FETT-NETO, A. G.; ALFENAS, A. C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. In: WALTER, C.; CARSON, M. (Eds.). **Plantation forest biotechnology for the 21<sup>th</sup> century**. Kerala, India: Research Signposts, 2004. p. 303-333.

ASSIS, T. F.; ROSA, O. P.; GONÇALVES, S. I. Propagação por microestaquia. In: Congresso Florestal Estadual, 7, 1992, Nova Prata. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 1992. p. 824-836.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF**: ano base 2006. Brasília: ABRAF, 2007. 80 p.

- CARDOSO, G. V. **Otimização do cozimento kraft para produção de celulose a partir de madeiras de *Eucalyptus globulus* com diferentes teores de lignina.** 2002. 147 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- CARDOSO, G. V.; FRIZZO, S. M. B.; ROSA, C. A. B.; FOELKEL, C. E. B.; ASSIS, T. F.; OLIVEIRA, P. Variação na densidade básica da madeira de *Eucalyptus globulus* no sentido longitudinal da árvore. In: CONGRESSO E EXPOSIÇÃO ANUAL DE CELULOSE E PAPEL, 35, 2002, São Paulo. **Anais...** São Paulo: ABTCP, 2002. p. 1-4.
- CARVALHO, A. M. **Valorização da madeira do híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* através da produção conjunta de madeira serrada em pequenas dimensões, celulose e lenha.** 2000. 129 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Madeiras) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- DEL PONTE, E. M.; MATTEI, V. L.; PETERS, J. A. ASSIS, T. F. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus* Labill. **Revista Árvore**, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2001.
- GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G.-J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture: the background.** 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, p. 29-64.
- GOMES, A. L. **Propagação clonal: princípios e particularidades.** Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 1987. 69 p. (Série Didáctica, Ciências Aplicadas, 1).
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.
- GREENWOOD, M. S.; HUTCHISON, K. W. Maturation as a development process. In: AHUJA, M. R.; LIBBY, W. J. (Eds.). **Clonal Forestry I: genetics and biotechnology.** Budapest: Springer-Verlag, 1993. p. 14-33.
- HACKETT, W. P. Donor plant maturation and adventitious root formation. In: DAVIES, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. (Eds.). **Adventitious root formation in cuttings.** Portland: Dioscorides Press, 1987. p. 11-28. (Advances in Plant Sciences Series, 2).
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T. GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices.** 7. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880 p.
- HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e sua evolução no Brasil.** Piracicaba: IPEF/ESALQ/USP, 2000. 10 p. (Circular Técnica, 192).
- LIBBY, W. J.; AHUJA, M. R. The genetics of clones. In: AHUJA, M. R.; LIBBY, W. J. (Eds.). **Clonal forestry I: genetics and biotechnology.** Budapest: Springer-Verlag, 1993. p. 5-13.
- MORA, A. L.; GARCIA, C. H. **A cultura do eucalipto no Brasil.** São Paulo: SBS, 2000. 112 p.
- RATNIEKES, E.; ASSIS, T. F. O que há adiante da árvore? **O papel**, v. 54, n. 1, p. 41-48, 1993.

ROSA, C. A. B. **Influência do teor de lignina da madeira de *Eucalyptus globulus* na produção e na qualidade da celulose Kraft**. 2003. 140 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

RUY, O. F. **Variação da qualidade da madeira em clones de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake da Ilha de Flores, Indonésia**. 1998. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Madeiras) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SHIMIZU, J. Aptidão de espécies e procedências de *Eucalyptus* para reflorestamento no planalto do Rio Grande do Sul. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 12, p. 1-12, 1986.

TITON, M. **Propagação clonal de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia e microestaquia**. 2001. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

WENDLING, I.; XAVIER, A.; GOMES, J. M.; PIRES, I. E.; ANDRADE, H. B. Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. **Revista Árvore**, v. 24, n. 2, p. 181-186, 2000.

XAVIER, A. **Silvicultura clonal I: princípios e técnicas de propagação vegetativa**. Viçosa: UFV, 2002. 64 p. (Caderno Didático, 92).

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotechnology Florestal**. Viçosa: Suprema, 2007b. p. 55-74.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996.

XAVIER, A.; WENDLING, I. **Miniestaquia na clonagem de *Eucalyptus***. Viçosa: SIF, 1998. 10 p. (Informativo Técnico SIF, 11).

XAVIER, A. A.; SANFUENTES, E. V.; JUNGHANS, D. T.; ALFENAS, A. C. Resistência de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens* à ferrugem (*Puccinia psidii*). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 731-735, 2007a.

## **ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE CLONES HÍBRIDOS DE *Eucalyptus globulus***

**RESUMO:** O presente estudo teve como objetivos avaliar o comportamento de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* e *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e o efeito de diferentes introduções *in vitro* na fase de estabelecimento *in vitro*. As minicepas, fornecedoras dos explantes para introdução *in vitro*, foram conduzidas em minijardim clonal semi-hidropônico. Segmentos nodais de 21 clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e oito clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* foram coletados, desinfestados e inoculados em meio de cultura MS, suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Após 30 dias em cultura, foram feitas as avaliações e concluiu-se que houve variação entre clones, bem como entre introduções *in vitro*, para as variáveis estudadas, sendo possível o estabelecimento *in vitro* da maioria dos clones.

**Palavras-chave:** Micropropagação, propagação *in vitro*, clonagem.

## ***IN VITRO* ESTABLISHMENT OF HYBRID CLONES OF *Eucalyptus globulus***

**ABSTRACT:** The present study aimed to evaluate the behavior of *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* and *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* clones and the effect of different *in vitro* introductions in the *in vitro* establishment phase. The mini-stump plants, explant providers for the *in vitro* introduction, were cultured in indoor semi-hydroponic clonal mini-hedging. Nodal segment explants of 21 *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* clones and eight *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* clones were collected, disinfected and inoculated in an MS culture medium, supplemented with 0.5 mg L<sup>-1</sup> of BAP and 0.1 mg L<sup>-1</sup> of NAA. After 30 days in the culture, evaluations were made and it was concluded that there were variations among the clones, as well as between *in vitro* introductions, for the studied variables, where the *in vitro* establishment was possible for most of the clones.

**Keywords:** Micropropagation, *in vitro* propagation, cloning.

## 1. INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus globulus* e seus híbridos são de grande interesse para o setor de celulose e papel, devido às características químicas, físicas e anatômicas da madeira de excelente qualidade para tal objetivo, principalmente alto rendimento em celulose e baixo teor de lignina (CARDOSO, 2002; ROSA, 2003; ALFENAS et al., 2004; XAVIER et al., 2007a).

A micropropagação apresenta-se como técnica promissora para viabilizar a clonagem massal de híbridos de *Eucalyptus globulus*, os quais apresentam dificuldades de enraizamento pela propagação por estaquia, principalmente no que envolve material adulto (ALFENAS et al., 2004; ASSIS et al., 2004). Na propagação clonal de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* e seus híbridos, a micropropagação pela proliferação de gemas axilares, tem sido utilizada com êxito no rejuvenescimento de clones selecionados, visando a melhoria do enraizamento de estacas no processo de produção de mudas (TITON, 2001; ASSIS et al., 2004; XAVIER et al., 2007b).

O sucesso de um protocolo de micropropagação depende claramente da fase de estabelecimento *in vitro*. Isso porque as etapas seguintes de multiplicação e posterior transferência para condições *ex vitro* só podem ser executadas após o estabelecimento de culturas assépticas e com bom vigor vegetativo (GEORGE e DEBERGH, 2008).

O estabelecimento *in vitro* inicia-se com o manejo das plantas matrizes e a seleção dos explantes mais adequados para a micropropagação e termina com a obtenção de uma cultura livre de contaminantes e suficientemente adaptada às condições *in vitro* (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Nesta fase, a oxidação fenólica (SHARMA e RAMAMURTHY, 2000), a contaminação por fungos e bactérias e a recalcitrância de alguns materiais genéticos têm sido os principais problemas encontrados (GEORGE, 2008).

Uma série de fatores influencia o sucesso da micropropagação, como o genótipo, o estado fisiológico da planta-matriz, seleção, coleta e tipo de explante, a assepsia utilizada, meio de cultura (nutrientes, vitaminas, carboidratos, dentre outros), concentrações e tipos de reguladores de crescimento, condições de incubação (fotoperíodo, luminosidade e temperatura) e habilidade do operador (HARTMANN et al., 2002; GEORGE e DEBERGH, 2008).

O estado fisiológico da planta matriz tem grande influência no posterior comportamento das culturas *in vitro*. Plantas bem nutridas, sem sintomas de deficiência nutricional ou hídrica, em geral, fornecem explantes melhores. Outro aspecto refere-se à condição fitossanitária das plantas matrizes, pois irá determinar a facilidade em descontaminar o explante durante o isolamento, principalmente quanto à contaminação endógena (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Os resultados obtidos durante todo o processo de micropropagação, principalmente na iniciação das culturas, são diretamente influenciados pelo genótipo, sendo este um dos fatores mais limitantes no sucesso da propagação *in vitro*. Isto se deve à especificidade das espécies e clones, quanto ao meio de cultura e condições ambientais, controladas por fatores genéticos (GAHAN e GEORGE, 2008). Desta forma, ao se trabalhar com novos genótipos é necessário avaliar a resposta desses materiais ao cultivo *in vitro* e posteriormente fazer os ajustes necessários para otimizar o processo de micropropagação.

Considerando a importância que o *Eucalyptus globulus* e seus híbridos com *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* representam atualmente para o setor de celulose e papel e a carência de estudos quanto a propagação clonal desses genótipos, justifica-se o estudo da resposta ao estabelecimento *in vitro* de clones selecionados, com vistas ao rejuvenescimento clonal.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivos avaliar o efeito de diferentes introduções *in vitro* e o comportamento de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* e *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* na fase de estabelecimento *in vitro* pela técnica de micropropagação por gemas axilares.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Fontes de explantes

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa – UFV, localizado no município de Viçosa, Minas Gerais.

O material utilizado para obtenção dos explantes foi proveniente de minicepas de 21 clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e oito clones de *Eucalyptus grandis* x *E.*

*globulus*, oriundos da empresa Celulose Nipo-Brasileira - Cenibra, localizada no município de Belo Oriente, Minas Gerais. Os clones utilizados nos experimentos são resultado do programa de melhoramento genético da empresa Cenibra e foram gerados a partir de cruzamentos utilizando polens de *Eucalyptus globulus*, provenientes do Instituto Raiz em Portugal, e como genitores femininos, matrizes superiores de *Eucalyptus grandis* ou *Eucalyptus urophylla* da própria empresa (Quadro 1).

Quadro 1 – Clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* e seus genitores femininos e masculinos.

Clones	Genitor Feminino	Genitor Masculino
	<i>Eucalyptus urophylla</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>
C01	U03	G02
C02	U10	G07
C03	U02	G09
C04	U09	G07
C05	U01	G02
C06	U10	G04
C07	U09	G06
C08	U05	G06
C09	U04	G09
C10	U02	G02
C11	U04	G07
C12	U08	G09
C14	U06	G10
C15	U05	G09
C16	U14	G07
C17	U13	G08
C18	U08	G03
C19	U12	G02
C20	U04	G03
C21	U13	G10
C22	U11	G01
	<i>Eucalyptus grandis</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>
C23	M16	G07
C24	M16	G04
C25	M16	G10
C26	M17	G07
C27	M19	G02
C28	M15	G06
C29	M18	G02
C30	M18	G11

Os clones foram selecionados em testes de progênie híbrida avaliando-se as características silviculturais (DAP, altura, forma, dentre outras) aos três anos de idade. Nesta idade, foram produzidas mudas pelo processo de estaquia convencional para multiplicação do material vegetativo, as quais foram conduzidas como minicepas em minijardim clonal, sob sistema semi-hidropônico de canaletão de areia, no Viveiro de Pesquisas Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa.

As minicepas foram conduzidas em casa de vegetação com as laterais abertas e coberta com plástico transparente de polietileno. As plantas receberam solução nutritiva por gotejamento, aplicada quatro vezes ao dia, numa vazão total diária de 4 L m<sup>-2</sup>. A solução nutritiva foi composta de nitrato de cálcio (0,920 g L<sup>-1</sup>), cloreto de potássio (0,240 g L<sup>-1</sup>), nitrato de potássio (0,140 g L<sup>-1</sup>), monoamônio fosfato (0,096 g L<sup>-1</sup>), sulfato de magnésio (0,364 g L<sup>-1</sup>), hidróferro (0,040 g L<sup>-1</sup>), ácido bórico (2,800 mg L<sup>-1</sup>), sulfato de zinco (0,480 mg L<sup>-1</sup>), sulfato de manganês (1,120 mg L<sup>-1</sup>), sulfato de cobre (0,100 mg L<sup>-1</sup>) e molibdato de sódio (0,040 mg L<sup>-1</sup>). A condutividade elétrica da solução nutritiva foi mantida em torno de 2,0 mS m<sup>-2</sup>.

## **2.2. Coleta e preparo dos explantes**

Dois dias antes da coleta das brotações dos clones, foi aplicada uma mistura de fungicida Orthocide 500® (Captan 50 % como princípio ativo) a 2,4 g L<sup>-1</sup> e óleo mineral Assist® a 10 mL L<sup>-1</sup>, conforme recomendações de ALFENAS et al. (2004). As brotações utilizadas (Figura 1A) foram provenientes da primeira coleta (primeira introdução), terceira coleta (segunda introdução) e quinta coleta (terceira introdução), correspondendo a 30, 90 e 150 dias após a poda do ápice das minicepas, respectivamente. Segmentos nodais medindo entre 3 e 4 cm foram coletados retirando-se as folhas do terceiro e quarto nós (comumente dotados de um par de gemas axilares), a partir do ápice das brotações (Figura 1B). Posteriormente, os explantes foram imersos em água desionizada autoclavada e transportados ao laboratório de cultura de tecidos. Durante todo o processo, os equipamentos utilizados foram esterilizados com solução de álcool a 70 % (v/v).



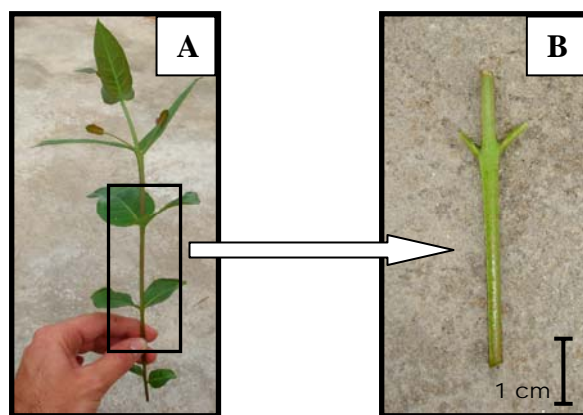


Figura 1 - Obtenção de explantes para iniciação da micropropagação de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*: (A) brotação recém coletada das minicepas, destacando a porção utilizada para obtenção dos explantes; (B) segmento nodal após preparo e padronização para introdução *in vitro*.

### 2.3. Introdução *in vitro*

Os segmentos nodais foram lavados por cinco vezes em água corrente e imersos em solução fungicida contendo 2,4 g L<sup>-1</sup> de Orthocide 500® (Captan 50 % como princípio ativo) durante 15 minutos. Posteriormente, foram lavados por cinco vezes em água desionizada autoclavada e imersos em solução de álcool a 70 % (v/v) por 30 segundos com agitação constante, dentro da câmara de fluxo laminar horizontal. Em seguida, foram imersos em solução de NaOCl a 1 % (v/v) Clarix®, acrescida de Tween 20 (3 gotas/100 mL de solução) durante 15 minutos. Finalmente, os segmentos nodais foram lavados em água deionizada autoclavada, por cinco vezes e os explantes preparados e inoculados verticalmente, sob condições assépticas, em tubos de ensaio de 15 cm x 2,5 cm, contendo 10 mL de meio de cultura.

O tempo desde a coleta dos explantes, em condições de campo, até a inoculação em meio de cultura foi inferior a três horas. Durante a coleta, o transporte e intervalos entre a desinfestação e inoculação, os explantes foram mantidos imersos em água desionizada autoclavada para evitar a desidratação.

O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) adicionado de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina – Sigma Co.), 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético – Sigma Co.), 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol (Sigma Co.), 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP30 (Polivinilpirrolidona – Synth Ltda), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Synth Ltda) e 7 g L<sup>-1</sup> de

ágar (Merck S.A.). O meio de cultura foi preparado utilizando água desionizada e o pH ajustado para  $5,8 \pm 0,05$  com NaOH (0,1 M) e HCl (0,1 M), antes da autoclavagem e da adição do ágar. A autoclavagem do meio de cultura foi realizada à temperatura de 121° C e pressão de aproximadamente  $1 \text{ kgf cm}^{-2}$ , durante 15 minutos.

Após inoculação, os explantes foram mantidos durante sete dias no escuro, visando reduzir o processo de oxidação, em sala de cultura a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e, posteriormente transferidos para fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância de  $80 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , fornecida por tubos fluorescentes branco-frios.

Foram utilizados dez clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e três clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (Quadro 2) para realização de três introduções *in vitro* (aos 30, 90 e 150 dias após a primeira poda das minicepas). Nos demais clones, onze de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e cinco de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, realizou-se apenas uma introdução *in vitro*.

Quadro 2 - Número de introduções *in vitro* realizadas para os clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*.

Híbrido	Nº de introduções	Clones
<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. globulus</i>	1	C02, C03, C05, C06, C07, C09, C10, C14, C19, C21 e C22
	3	C01, C04, C08, C11, C12, C15, C16, C17, C18 e C20
<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. globulus</i>	1	C23, C25, C26, C27 e C30
	3	C24, C28 e C29

#### 2.4. Condução e avaliações experimentais

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, compostas de parcelas com dez explantes, sendo os tratamentos constituídos de 21 clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e oito clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*.

Aos 30 dias após a inoculação, foram avaliadas as características porcentagem média de contaminação por fungos e bactérias, oxidação, explantes reativos (explantes que emitiram brotações axilares maiores que 0,5 cm) e o número médio de brotações por explante reativo. Os dados obtidos foram analisados por meio das médias e desvio padrão da média.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aspecto dos explantes, com relação às características estudadas, pode ser observado na Figura 2. Com base nos resultados foi possível observar grande diferença na resposta entre clones com relação às características estudadas, bem como variação entre introduções *in vitro* para um mesmo clone (Figuras 3 a 7).

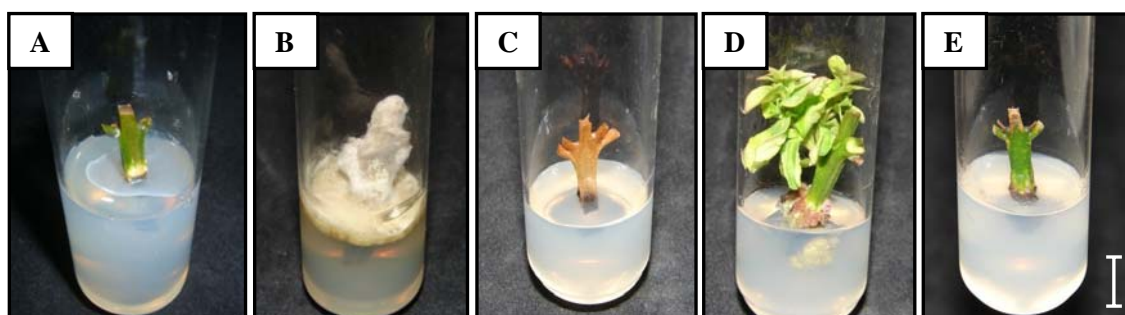


Figura 2 – Aspecto dos explantes de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, aos 30 dias após a inoculação: (A) explante contaminado por bactéria; (B) explante contaminado por fungo; (C) explante oxidado; (D) explante reativo; (E) explante sem resposta. Barra = 1 cm.

Na comparação entre híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, não foi observada tendência de melhores resultados para um cruzamento em relação ao outro, nas características estudadas.

A contaminação por bactérias teve uma amplitude de variação de 0 % (clone C28) a 72,5 % (clones C16, C17 e C19), sendo superior a 30 % para a maioria dos clones (Figura 3).

Embora a contaminação por bactérias endógenas tenha sido alta para a maioria dos clones, ela não afetou a emissão de brotações axilares, uma vez que foi possível obter brotações viáveis em explantes com contaminação bacteriana. Por outro lado, a contaminação por fungos e a oxidação dos explantes afetaram negativamente a emissão

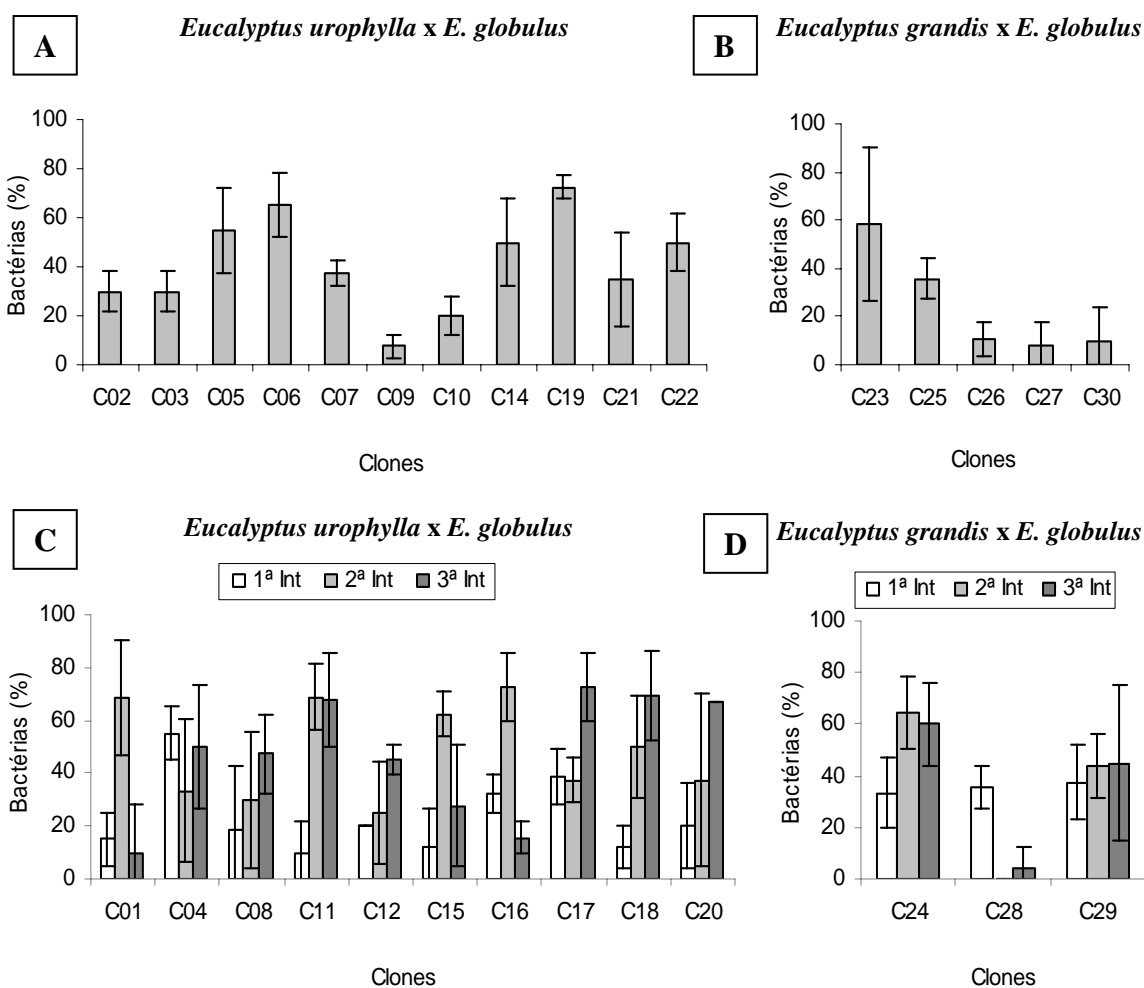


Figura 3 – Percentual médio de explantes contaminados com bactérias em clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* com uma (A e B) e três (C e D) introduções *in vitro* (Int), aos 30 dias após a inoculação. Barras verticais indicam o desvio padrão das médias.

de brotações axilares, pois causaram a morte dos explantes.

As contaminações por fungos ocorreram em menor proporção em relação às contaminações por bactérias, sendo ausente nos clones C04, C16, C17 e C29 na primeira introdução *in vitro* e, também no clone C27, o qual teve apenas uma introdução (Figura 4). Na segunda introdução *in vitro*, apenas no clone C11 não foi observado o desenvolvimento de fungos, enquanto na terceira introdução todos os clones apresentaram explantes contaminados (Figura 4C e 4D). O maior percentual médio obtido de contaminação fúngica foi de 58,3 % (clone C28) na segunda introdução, sendo que na maioria dos clones estes valores foram inferiores a 20 %.

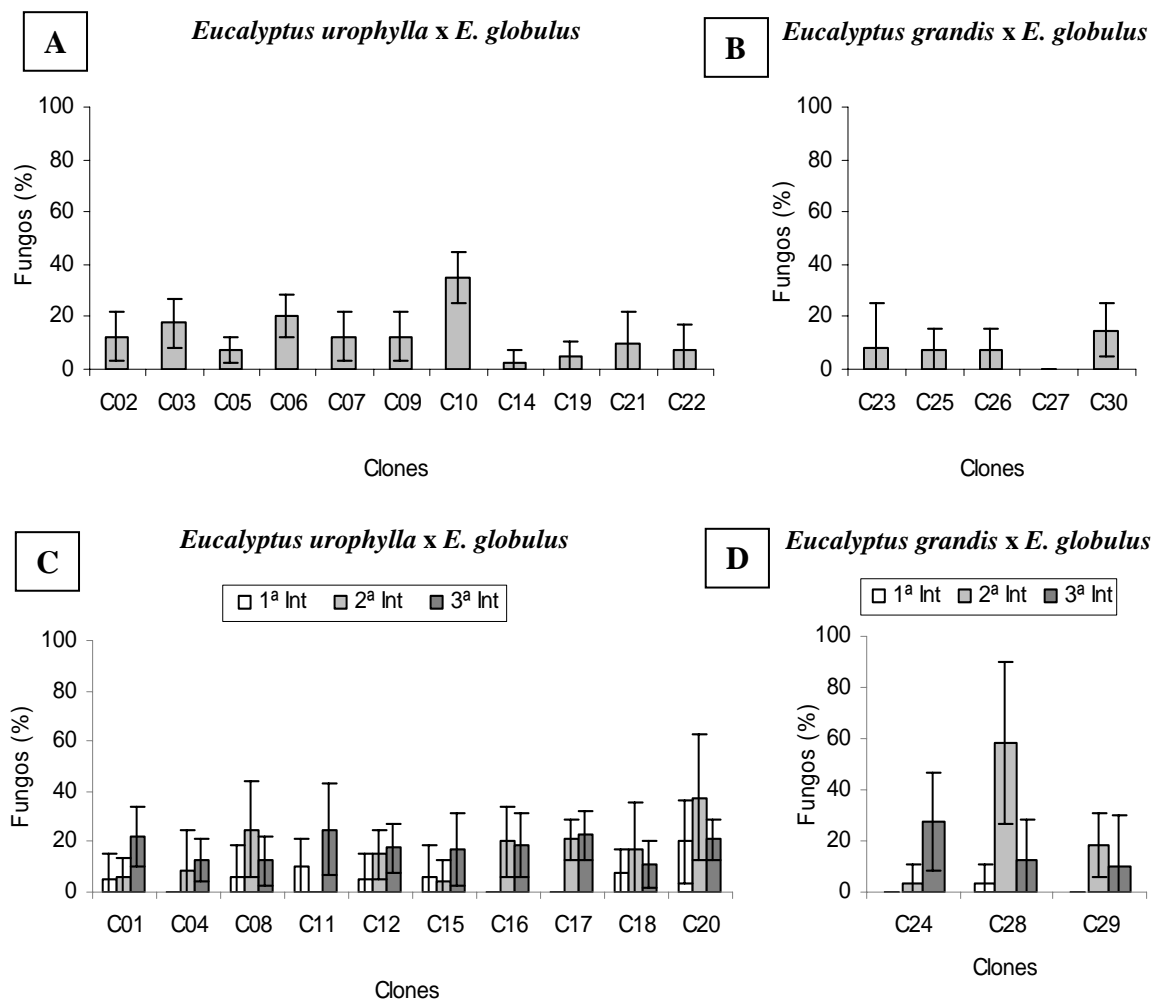


Figura 4 – Percentual médio de explantes contaminados com fungos em clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* com uma (A e B) e três (C e D) introduções *in vitro* (Int), aos 30 dias após a inoculação. Barras verticais indicam o desvio padrão das médias.

BRONDANI (2008) observou baixa contaminação por bactérias (inferior a 9 %) e alta contaminação por fungos (41,3 %) no estabelecimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunii*, concluindo que a contaminação fúngica foi o fator que causou a maior perda de material nessa fase da micropropagação. Da mesma forma, ALMEIDA et al. (2008) também obtiveram baixa contaminação por bactérias (inferior a 20 %) e alta contaminação por fungos (superior a 25 %) no estabelecimento *in vitro* de *Eucalyptus dunii*, diferindo dos resultados obtidos no presente estudo.

Ao comparar as três introduções *in vitro*, observa-se tendência de aumento na contaminação por fungos e bactérias na segunda e terceira introdução, com algumas exceções (Figuras 3C, 3D, 4C e 4D). Isto pode estar associado às condições ambientais, bem como as superfícies cortadas deixadas nas plantas matrizes, quando das podas

sucessivas, para coleta do material propagativo. Isto pode ter facilitado a contaminação endógena dos tecidos por microrganismos. SHARMA e RAMAMURTHY (2000) observaram haver aumento na contaminação de explantes coletados em épocas mais quentes do ano, chegando a comprometer o estabelecimento *in vitro* de *Eucalyptus tereticornis* nesse período.

Em relação à oxidação fenólica dos explantes, observou-se um comportamento variado, tanto entre clones, quanto entre introduções *in vitro*, sendo que a maioria dos clones apresentaram oxidação inferior a 30 % (Figura 5). O valor máximo de explantes oxidados foi apresentado pelo clone C29 na segunda introdução, com média de 56,3 %. Nenhuma tendência foi observada entre introduções *in vitro*, sendo que, de modo geral, os valores foram bem próximos para um mesmo clone (Figura 5C e 5D).

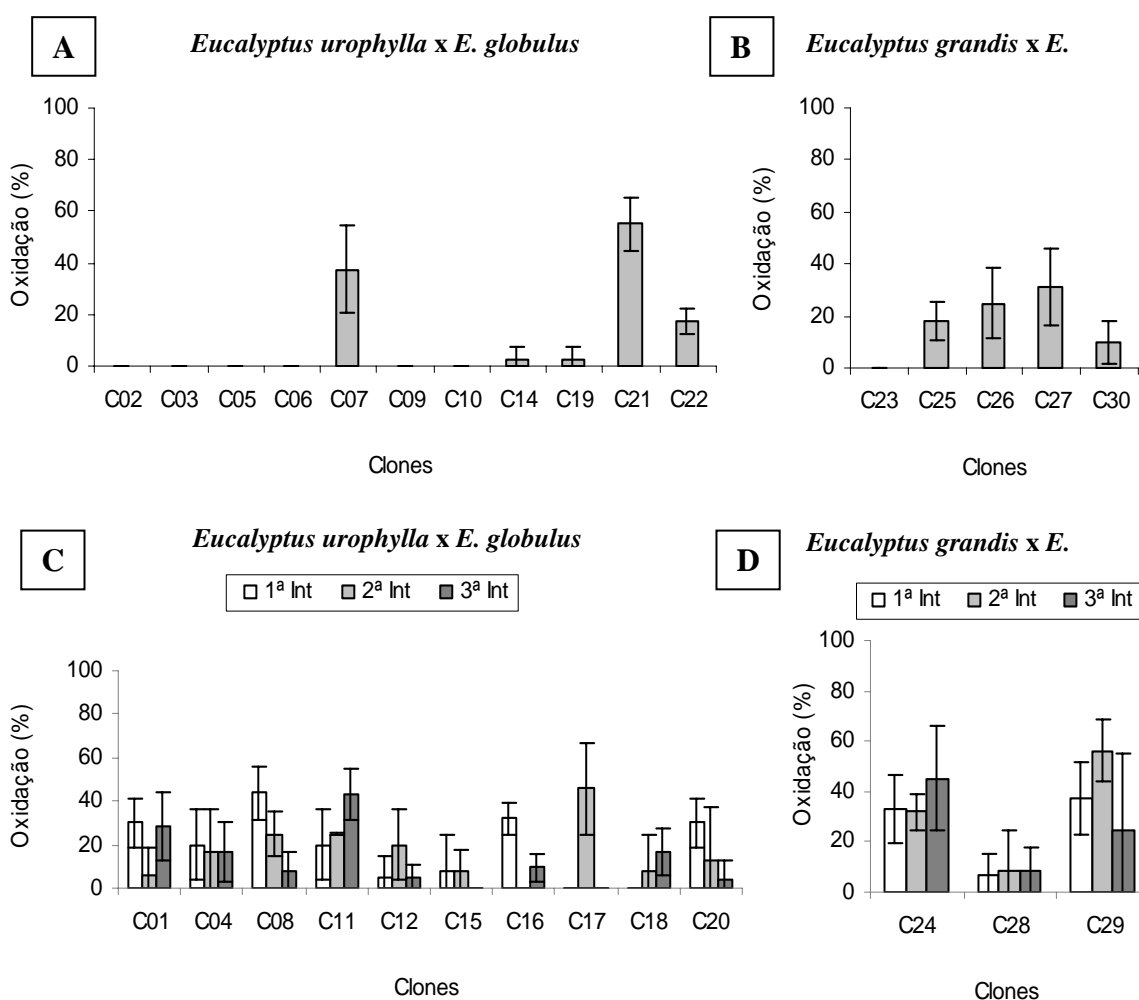


Figura 5 – Percentual médio de explantes oxidados em clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* com uma (A e B) e três (C e D) introduções *in vitro* (Int), aos 30 dias após a inoculação. Barras verticais indicam o desvio padrão das médias.

Vários clones não apresentaram oxidação ou esta ocorreu em baixa intensidade. Estes resultados estão próximos aos encontrados por BRONDANI (2008) que obteve oxidação fenólica inferior a 6 % dos explantes, no estabelecimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunii*.

A oxidação fenólica tem sido um problema associado com a micropropagação de espécies lenhosas, sendo reportada em diversos trabalhos (SHARMA e RAMAMURTHY, 2000; ROCHA, 2005; CYSNE, 2006; PINTO et al., 2008; SILVA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2008; BRONDANI, 2008). Essa ocorre pelo corte que danifica as células dos tecidos, promovendo a liberação de compostos fenólicos precursores da síntese de lignina, os quais modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000), podendo levar a morte dos tecidos.

Em relação ao processo de indução de brotações, aos 30 dias após a inoculação, exceto os clones C15 (na primeira introdução) e C25, todos os demais apresentaram brotações aptas a serem transferidas para a etapa de multiplicação *in vitro*. Altos percentuais de explantes com brotações foram obtidos para alguns clones, sendo que o clone C14 foi o mais responsivo com 95 % (Figura 6). Uma pequena tendência de aumento na resposta dos explantes pode ser observada na segunda e terceira introduções para a maioria dos clones (Figura 6C e 6D).

Foi observado que alguns clones apresentaram altas taxas de explantes sem resposta à indução de brotações. Os valores médios de explantes sem resposta entre clones variaram de 0 % (clones C10, C14 e C23) a 80 % (clones C19 e C15). Apesar de os explantes se manterem vivos, observado pela manutenção da coloração verde dos explantes (ERIG e SCHUCH, 2005), essa ausência de resposta não é desejável durante a fase de estabelecimento *in vitro*, uma vez que as brotações são necessárias ao prosseguimento do processo de micropropagação.

De acordo com SHARMA e RAMAMURTHY (2000) para o sucesso da micropropagação é necessário que apenas alguns explantes emitam brotações livres de contaminação. No entanto, quando se necessita de grande quantidade de material micropropagado, maiores taxas de explantes com brotações podem ser necessárias para aumentar rapidamente a quantidade de material produzido.

GOMES e CANHOTO (2003) obtiveram média de 10 % de explantes com brotações para segmentos nodais de *Eucalyptus nitens*. Os autores atribuíram a baixa indução de brotações ao alto nível de contaminação, que foi superior a 50 %. Por outro

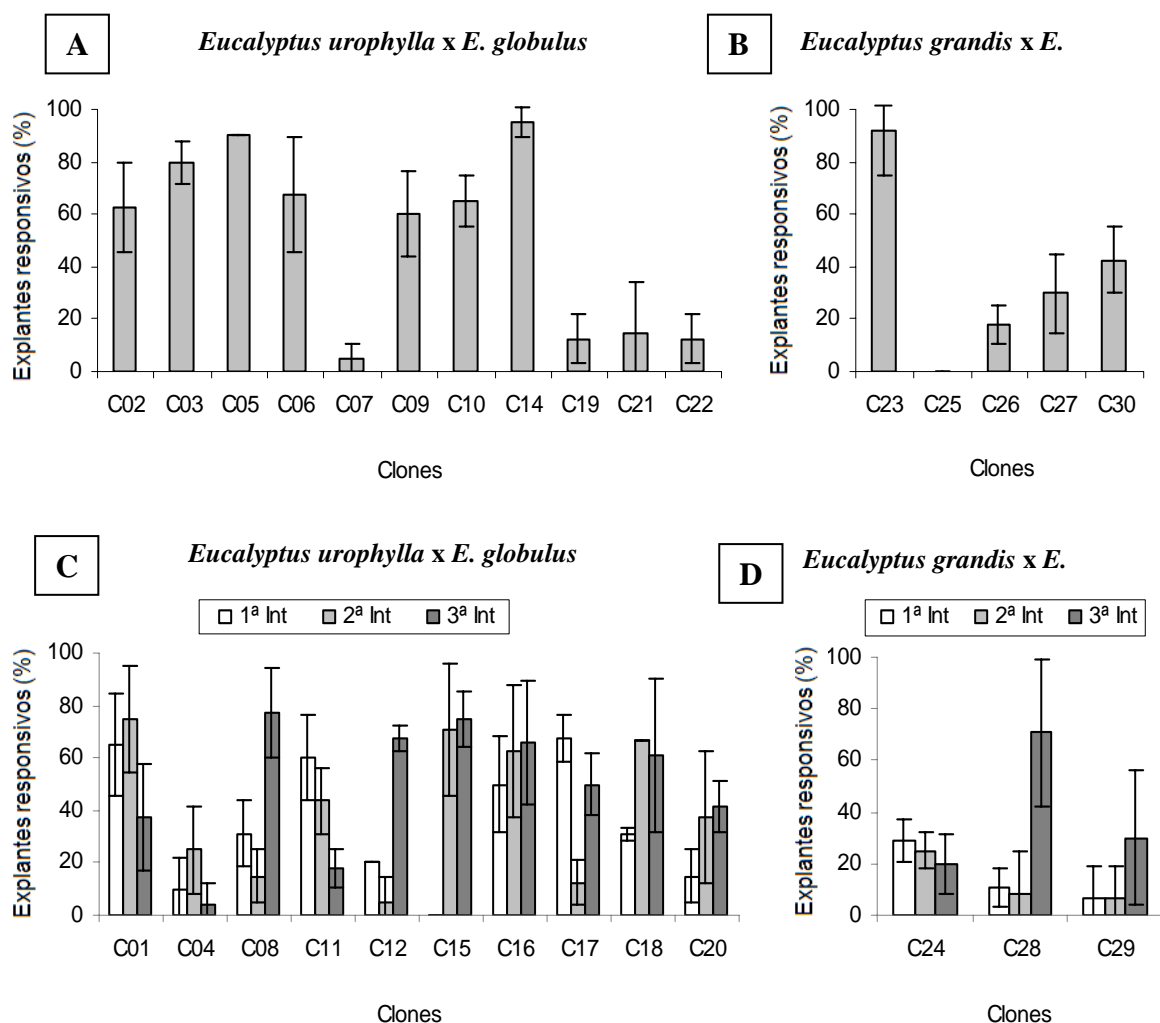


Figura 6 – Percentual médio de explantes responsivos em clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* com uma (A e B) e três (C e D) introduções *in vitro* (Int), aos 30 dias após a inoculação. Barras verticais indicam o desvio padrão das médias.

lado, KAPOOR e CHAUHAN (1992) encontraram média de 72 % de explantes responsivos em um híbrido de *Eucalyptus torelliana* x *E. citriodora*, e YANG et al. (1995) obtiveram até 100 % de explantes com brotações em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Dessa forma, observa-se que resultados variados, para explantes responsivos na fase de estabelecimento *in vitro*, são obtidos em função do material vegetal e das condições de cultivo utilizadas.

Seguindo o mesmo padrão das demais características estudadas, o número médio de brotações por explante variou entre clones e entre introduções *in vitro* (Figura 7). O clone C16 apresentou o valor médio máximo de 3,7 brotos por explante. De modo geral,



observou-se tendência de aumento na produção de brotos na segunda e terceira introduções, com algumas exceções (Figura 7C e 7D).

Em termos gerais, a formação das primeiras brotações axilares iniciou-se aos sete dias após a inoculação em meio de cultura de indução, estando aptas para transferência para o primeiro subcultivo, em meio de multiplicação, a partir do 25º dia após a inoculação.

SHARMA e RAMAMURTHY (2000), estudando o estabelecimento *in vitro* de árvores elite de *Eucalyptus tereticornis* com quatro anos de idade, também encontraram grandes variações na contaminação por fungos e bactérias, oxidação e produção de brotos entre os meses do ano, bem como entre os genótipos estudados.

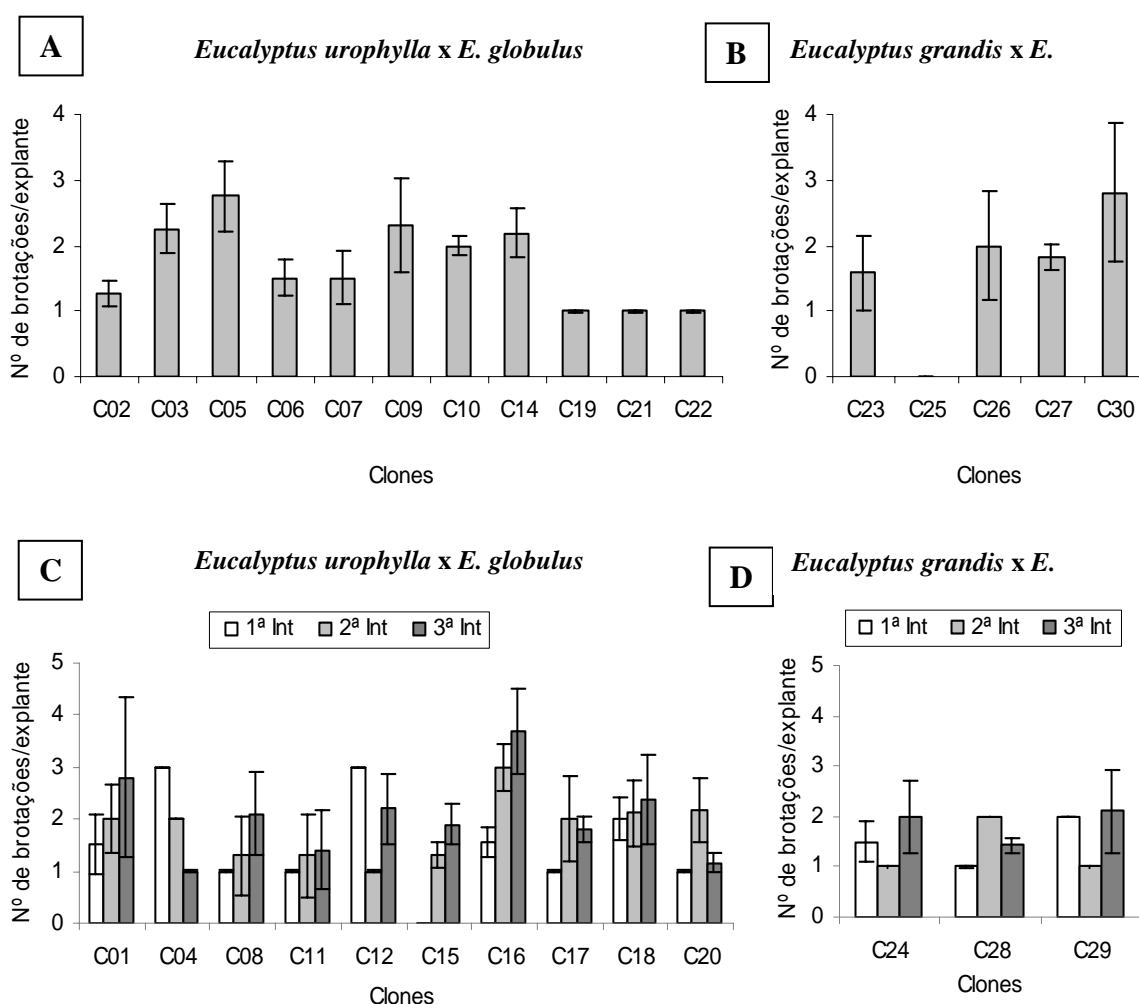


Figura 7 – Número médio de brotações por explante relativo em clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* com uma (A e B) e três (C e D) introduções *in vitro* (Int), aos 30 dias após a inoculação. Barras verticais indicam o desvio padrão das médias.

Na definição da posição de coleta dos explantes na planta matriz, foi observado em testes preliminares que explantes mais tenros, coletados de porções mais apicais dos ramos (primeiro e segundo par de folhas), apresentaram alta oxidação, já detectada durante o processo de desinfestação. Da mesma forma, explantes coletados de partes mais lignificadas dos ramos (após o quarto par de folhas) não apresentaram emissão satisfatória de brotações, sendo observada grande formação de calos na base dos explantes (parte inserida no meio de cultura) com subsequente escurecimento do meio de cultura. O uso de explantes apicais pode ser necessário quando a contaminação endógena dos tecidos é muito alta, pois estes explantes apresentam menores taxas de contaminação, conforme observado por GOMES e CANHOTO (2003). No entanto, estes explantes requerem cuidados adicionais no controle da oxidação fenólica.

No presente estudo, observou-se que há variação entre as introduções *in vitro* para a maioria dos clones nas variáveis estudadas. Essas diferenças para um mesmo clone podem ser causadas por uma série de fatores relacionados às condições fisiológicas e fitossanitárias das minicepas no momento da coleta dos explantes. Foi observado um aumento do vigor e número de brotações produzidas pelas minicepas na segunda e terceira coleta em relação à primeira. Isto pode ter sido promovido por alguns fatores como o revigoramento nutricional das plantas no canaletão sob fertirrigação diária e condições climáticas relativas à época do ano, dentre outros. Esse aumento no vigor poderia explicar, em parte, a tendência de aumento de explantes responsivos e número de brotações por explante na segunda e terceira introduções, pois plantas em pleno crescimento vegetativo, bem nutridas, sem deficiência nutricional ou hídrica são reconhecidamente como as que fornecem explantes melhores para iniciação da micropropagação.

#### **4. CONCLUSÕES**

Considerando as condições experimentais, e com base nos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

- A contaminação dos explantes por bactérias foi alta para a maioria dos clones, mas não comprometeu o estabelecimento *in vitro*, uma vez que foi possível o resgate das brotações emitidas livres de microrganismos.

- A contaminação fúngica e a oxidação causaram morte de explantes, porém em índices relativamente baixos na maioria dos clones, não comprometendo o estabelecimento *in vitro*.
- A indução de brotações axilares foi satisfatória, exceto para dois clones (C25 e C15) na primeira introdução *in vitro* que não emitiram brotações.
- A resposta entre clones e entre introduções *in vitro* foi diversificada para todas as variáveis estudadas, havendo uma tendência de melhores resultados na segunda e terceira introdução para explantes reativos e número de brotações emitidas.
- Em termos gerais, o protocolo utilizado de estabelecimento *in vitro* dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* foi satisfatório, havendo produção de brotações livres de contaminação por fungos e bactérias e aptas para as próximas fases da micropropagação.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. 442 p.
- ALMEIDA, J. R.; MARTINS, C. R.; DUTRA, L. F. Desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* visando estabelecimento *in vitro*. **Revista da FZVA**, Uruguaina, v. 15, n. 1, p. 54-60, 2008.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Alli.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- ASSIS, T. F.; FETT-NETO, A. G.; ALFENAS, A. C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. In: WALTER, C.; CARSON, M. (Eds.). **Plantation forest biotechnology for the 21<sup>th</sup> century**. Kerala, India: Research Signposts, 2004. p. 303-333.
- BRONDANI, G. E. **Miniestaquia e micropropagação de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2008. 118 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- CARDOSO, G. V. **Otimização do cozimento kraft para produção de celulose a partir de madeiras de *Eucalyptus globulus* com diferentes teores de lignina**. 2002. 147 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- CYSNE, J. R. B. **Propagação *in vitro* de *Moringa oleifera* L.** 2006. 81 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Estabelecimento *in vitro* de Mirtilo a partir de segmentos nodais. **Scientia Agrária**, v. 6, n. 1-2, p. 91-96, 2005.
- GAHAN, P. B.; GEORGE, E. F. Adventitious regeneration. In: GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G.-J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, p. 355-402.
- GEORGE, E. F. Plant Tissue Culture Procedure - Background. In: GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G.-J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, p. 1-28.
- GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G.-J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, p. 29-64.
- GOMES, F.; CANHOTO, J. M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (Shining gum). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 39, p. 316-321, 2003.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T. GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880 p.
- KAPOOR, M. L.; CHAUHAN, M. S. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*E. torrelliana* F. V. Muell x *E. citriodora* Hook). **Silvae Genetica**, v. 41, n. 6, p. 305-307, 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PINTO, G.; SILVA, S.; PARK, Y.-S.; NEVES, L.; ARAÚJO, C.; SANTOS, C. Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 95, p. 79-88, 2008.
- ROCHA, S. C. **Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de canjarana (*Cabralea canjerana*)**. 2005. 80 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- ROSA, C. A. B. **Influência do teor de lignina da madeira de *Eucalyptus globulus* na produção e na qualidade da celulose Kraft**. 2003. 140 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- SHARMA, S. K.; RAMAMURTHY, V. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 511-518, 2000.
- SILVA, L. C. SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A.; ERIG, A. C.; ANTUNES, L. E. C. Efeito da iluminação e pré-lavagem das brotações de mirtilo cv. Florida no estabelecimento *in vitro*. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, n. 1, p. 127-129, 2007 (Nota Técnica).

TITON, M. **Propagação clonal de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia e microestaquia**. 2001. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BOREM, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: Suprema, 2007b. p. 55-74.

XAVIER, A. A.; SANFUENTES, E. V.; JUNGHANS, D. T.; ALFENAS, A. C. Resistência de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens* à ferrugem (*Puccinia psidii*). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 731-735, 2007a.

YANG, J.-C.; CHUNG, J.-D.; CHEN, Z.-Z. Vegetative propagation of adult *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* and comparison of growth between micropropagated plantlets and rooted cuttings. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 170-173, 1995.

## MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE CLONES HÍBRIDOS DE *Eucalyptus globulus*

**RESUMO:** O presente estudo teve como objetivos avaliar a resposta de clones híbridos de *Eucalyptus globulus* nos meios de cultura MS e JADS durante a fase de multiplicação *in vitro*. Os explantes foram provenientes da fase de estabelecimento *in vitro* de 21 clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*, sendo 11 clones com três introduções *in vitro*, e de seis clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, sendo dois clones com três introduções. Os clones foram subcultivados mensalmente nos meios de cultura MS e JADS, com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Concluiu-se que, de modo geral, o meio de cultura MS foi superior em termos de taxa de multiplicação; alguns clones apresentaram boas taxas de multiplicação e outros se mostraram recalcitrantes à micropropagação; a taxa de multiplicação apresentou tendência de aumento nos primeiros subcultivos e posterior queda para a maioria dos clones.

**Palavras-chave:** Meio de cultura, propagação *in vitro*, micropropagação.

## *IN VITRO* MULTIPLICATION OF HYBRID CLONES OF *Eucalyptus globulus*

**ABSTRACT:** The present study aimed to evaluate the response of hybrid *Eucalyptus globulus* clones in MS and JADS culture media during the *in vitro* multiplication phase. The explants originated from the *in vitro* establishment phase of 21 *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* clones, of which 11 clones had three *in vitro* introductions, and of six *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* clones, of which two clones had three introductions. The clones were subcultivated monthly in MS and JADS culture media, with 0.5 mg L<sup>-1</sup> of BAP and 0.01 mg L<sup>-1</sup> of NAA. It was concluded that, overall, the MS culture medium was superior in terms of the multiplication rate; some clones presented good multiplication rates and others appeared recalcitrant to micropropagation; the multiplication rate presented a tendency to increase in the first subcultures with a subsequent fall for most of the clones.

**Keywords:** Culture medium, *in vitro* propagation, micropropagation.

## 1. INTRODUÇÃO

Recentemente tem crescido o interesse da indústria de papel e celulose pelo *Eucalyptus globulus*, sobretudo pelos significativos ganhos em qualidade da madeira para esta finalidade (CARDOSO, 2002; ROSA, 2003; XAVIER et al., 2007a; ASSIS e MAFIA, 2007). Os plantios da espécie tem se restringido a regiões de clima temperado devido às suas exigências edafoclimáticas (ELDRIDGE et al., 1993). Nas regiões tropicais, a hibridação com outras espécies do gênero, como *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis*, tem sido a alternativa encontrada para melhorar a adaptação ambiental da espécie e aproveitar as características tecnológicas da madeira, além de maior facilidade de propagação vegetativa, dentre outras vantagens (ALFENAS et al., 2004).

O *Eucalyptus globulus* é reconhecidamente recalcitrante ao enraizamento de estacas, especialmente no que envolve material adulto, dificultando o aproveitamento dos benefícios da clonagem (ALFENAS et al., 2004; ASSIS e MAFIA, 2007). Desta forma, técnicas alternativas como a propagação *in vitro*, visando ao rejuvenescimento de clones com material vegetativo em fase adulta, podem ser promissoras para viabilizar a propagação vegetativa da espécie e seus híbridos.

As técnicas de propagação *in vitro* têm sido largamente difundidas e com aplicações comprovadas na área florestal (XAVIER et al., 2007b), onde grande parte dos estudos para *Eucalyptus* tem sido direcionada para a otimização da clonagem de árvores adultas (DEL PONTE et al., 2001). Especialmente em *Eucalyptus*, a micropropagação mediante proliferação de gemas axilares tem sido a mais utilizada, sendo mais simples do que os sistemas de micropropagação por embriogênese somática e organogênese, por se basear na proliferação de gemas pré-formadas, reproduzindo *in vitro* um fenômeno natural (GOMES e CANHOTO, 2003; XAVIER et al., 2007b).

Na micropropagação o rejuvenescimento dos tecidos é obtido com os sucessivos subcultivos do material vegetal na fase de multiplicação *in vitro* (ASSIS e MAFIA, 2007). Em *Eucalyptus*, quando o objetivo é o rejuvenescimento de clones selecionados na idade adulta, visando aumento da capacidade de enraizamento, tem-se recomendado, no mínimo, a realização de 12 subcultivos na fase de multiplicação (XAVIER et al., 2007b).

O estado fisiológico da planta matriz tem grande influência no posterior comportamento das culturas *in vitro*. A morfogênese, o crescimento e as taxas de multiplicação *in vitro* podem ser melhoradas com um adequado pré-tratamento ambiental

das plantas matrizes, particularmente quanto à nutrição e ao controle fitossanitário. Da mesma forma, o tipo de explante e a época de coleta podem ser determinantes na resposta *in vitro* (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; HARTMANN, 2002; GEORGE e DEBERGH, 2008).

Os meios de cultura utilizados na micropropagação fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998). Na micropropagação de *Eucalyptus*, o meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) tem sido o mais utilizado (KAPOOR et al., 1992; BENNETT et al., 1994; YANG et al., 1995; SHARMA e RAMAMURTHY, 2000; GRAÇA et al., 2001; NUGENT et al., 2001; SOBROSA e CORDER, 2003; WATT et al., 2003; BILLARD et al., 2005; GLOCKE, et al., 2006; BRONDANI, 2008). O meio JADS (CORREIA, 1993), desenvolvido especificamente para *Eucalyptus grandis*, também tem sido testado em alguns trabalhos de micropropagação com as espécies do gênero (LIMA e GONÇALVES, 1998; SANTOS et al., 2004; ANDRADE et al., 2006; QUISEN, 2007; BRAVO et al., 2008).

A resposta de explantes em um sistema de cultivo *in vitro* também depende do genótipo do material colocado em cultura (SOBROSA e CORDER, 2003; GEORGE e DEBERGH, 2008). Normalmente se observa variabilidade clonal no comportamento *in vitro*; se por um lado ocorrem genótipos que se adaptam facilmente à condição *in vitro*, respondendo bem a vários meios de cultura, por outro, é frequente a necessidade de se otimizar meios de cultura para cada clone ou grupos de clones (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Diante da importância que os híbridos de *Eucalyptus globulus* representam para o setor de celulose e papel e da carência de estudos quanto à propagação clonal desses genótipos, o presente trabalho teve como objetivos avaliar o efeito dos meios de cultura MS e JADS na resposta de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* durante a fase de multiplicação *in vitro*, através da técnica de micropropagação pela proliferação de gemas axilares, visando ao rejuvenescimento clonal.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material experimental

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa – UFV, localizado no município de Viçosa, Minas Gerais.

Os explantes utilizados na multiplicação *in vitro* foram provenientes da fase de estabelecimento *in vitro* de 21 clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e seis clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, oriundos da empresa Cenibra, localizada no município de Belo Oriente, Minas Gerais. Os clones utilizados nos experimentos são resultado do programa de melhoramento genético da empresa Cenibra e foram gerados a partir de cruzamentos utilizando polens de *Eucalyptus globulus*, provenientes do Instituto Raiz em Portugal, e como genitores femininos, matrizes superiores de *Eucalyptus grandis* ou *Eucalyptus urophylla* da própria empresa (Quadro 1).

Os clones foram selecionados em testes de progênie híbrida avaliando-se as características silviculturais (DAP, altura, forma, dentre outras) aos três anos de idade. Nesta idade, foram produzidas mudas pelo processo de estaquia convencional para multiplicação do material vegetativo, as quais foram conduzidas como minicepas em minijardim clonal, sob sistema semi-hidropônico de canaletão de areia, no Viveiro de Pesquisas Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, de onde se coletaram os explantes para o estabelecimento *in vitro*.

As minicepas estabelecidas no minijardim clonal foram conduzidas em casa de vegetação com as laterais abertas e coberta com plástico transparente de polietileno. As plantas receberam solução nutritiva por gotejamento, aplicada quatro vezes ao dia, numa vazão total diária de 4 L m<sup>-2</sup>. A solução nutritiva foi composta de nitrato de cálcio (0,920 g L<sup>-1</sup>), cloreto de potássio (0,240 g L<sup>-1</sup>), nitrato de potássio (0,140 g L<sup>-1</sup>), monoamônio fosfato (0,096 g L<sup>-1</sup>), sulfato de magnésio (0,364 g L<sup>-1</sup>), hidróferro (0,040 g L<sup>-1</sup>), ácido bórico (2,800 mg L<sup>-1</sup>), sulfato de zinco (0,480 mg L<sup>-1</sup>), sulfato de manganês (1,120 mg L<sup>-1</sup>), sulfato de cobre (0,100 mg L<sup>-1</sup>) e molibdato de sódio (0,040 mg L<sup>-1</sup>). A condutividade elétrica da solução nutritiva foi mantida em torno de 2,0 mS m<sup>-2</sup>.

Quadro 1 – Clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* e seus genitores femininos e masculinos.

Clones	Genitor Feminino	Genitor Masculino
	<i>Eucalyptus urophylla</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>
C01	U03	G02
C02	U10	G07
C03	U02	G09
C04	U09	G07
C05	U01	G02
C06	U10	G04
C07	U09	G06
C08	U05	G06
C09	U04	G09
C10	U02	G02
C11	U04	G07
C12	U08	G09
C13	U07	G05
C14	U06	G10
C15	U05	G09
C16	U14	G07
C17	U13	G08
C18	U08	G03
C19	U12	G02
C20	U04	G03
C22	U11	G01
	<i>Eucalyptus grandis</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>
C23	M16	G07
C24	M16	G04
C26	M17	G07
C27	M19	G02
C29	M18	G02
C30	M18	G11

O estabelecimento *in vitro* foi realizado utilizando-se como explantes segmentos nodais medindo de 3 a 4 cm de comprimento, que foram coletados, desinfestados e inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), adicionado de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina – Sigma Co.), 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético – Sigma Co.), 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol (Sigma Co.), 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP30 (Polivinilpirrolidona – Synth Ltda), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Synth Ltda) e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar (Merck S.A.). Após inoculação, os explantes foram mantidos durante sete dias no escuro, visando reduzir o processo de oxidação, em sala de cultura a 25 ± 2 °C e, posteriormente mantidos por 23 dias em fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância de 80 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecidas por tubos fluorescentes branco-frios.

Em 11 clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e dois clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, foram usadas brotações provenientes de três introduções *in vitro* (realizadas aos 30, 90 e 150 dias após a primeira poda das minicepas em condições de viveiro). Nos demais clones, dez de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e quatro de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, utilizou-se brotações provenientes de apenas uma introdução *in vitro*.

## 2.2. Multiplicação *in vitro*

Para a iniciação da fase de multiplicação, as brotações produzidas na fase de estabelecimento *in vitro* foram preparadas e inoculadas, sob condições assépticas, em tubos de ensaio de 15 cm x 2,5 cm, contendo 10 mL do meio de cultura. Foram usados os meios de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e JADS (CORREIA, 1993) adicionados de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina – Sigma Co.), 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético – Sigma Co.), 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol (Sigma Co.), 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP30 (Polivinilpirrolidona – Synth Ltda), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Synth Ltda) e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar (Merck S.A.). Os meios de cultura foram preparados utilizando água deionizada e o pH ajustado para 5,8 ± 0,05 com NaOH (0,1 M) e HCl (0,1 M), antes da autoclavagem e da adição do ágar. A autoclavagem dos meios de cultura foi realizada à temperatura de 121° C e pressão de aproximadamente 1 kgf cm<sup>-2</sup>, durante 15 minutos.

A cada 30 dias, procedeu-se o subcultivo dos explantes para novo meio de cultura de igual composição, isolando tufos de brotações padronizados com duas a três brotações maiores do que 2 mm e com bom vigor vegetativo (Figura 1).

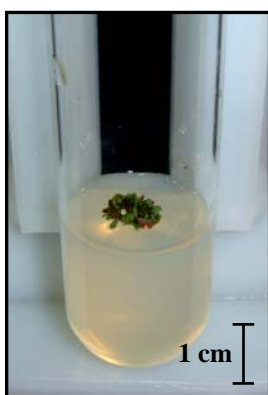


Figura 1 – Tufo de brotação, recém inoculado, utilizado como explante padrão na fase de multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*.

Após inoculação, os explantes foram mantidos em sala de cultura a  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância de  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecidas por tubos fluorescentes branco-frios.

### **2.3. Condução e avaliações experimentais**

O experimento foi conduzido segundo o delineamento inteiramente casualizado, utilizando 20 repetições compostas de um explante (tufo de brotação) por repetição. Para os clones com três introduções *in vitro* (11 clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e dois clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*) testou-se dois meios de cultura (MS e JADS) ao longo de nove, sete e cinco subcultivos para a primeira, segunda e terceira introdução *in vitro*, respectivamente. Para os clones com apenas uma introdução *in vitro* (10 clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e quatro clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*) foram testados dois meios de cultura (MS e JADS) ao longo de cinco subcultivos.

Após 30 dias em cultura, foi avaliada a taxa de multiplicação (número de tufos de brotações produzidos por explante) em cada subcultivo, sendo os dados obtidos analisados por meio das médias e desvio padrão.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Com base nos resultados (Quadros 2, 3 e 4), observou-se respostas diferenciadas na maioria dos clones para a taxa de multiplicação ao longo dos subcultivos, bem como pequenas diferenças entre meios de cultura e entre introduções *in vitro* para alguns clones.

Ao comparar as três introduções *in vitro*, observa-se tendência de melhores resultados na taxa de multiplicação na terceira introdução para a maioria dos clones, principalmente no meio de cultura MS (Quadros 2, 3 e 4). Segundo GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998) a planta matriz tem grande influência no posterior comportamento das culturas *in vitro*, sendo assim, essa tendência observada nos resultados obtidos pode estar relacionada à qualidade fisiológica das minicepas no momento da coleta dos explantes.

Quadro 2 – Número médio de tufos de brotações por explante dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* na primeira introdução *in vitro* nos meios de cultura MS e JADS em sucessivos subcultivos, após 30 dias em cultura.

<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. globulus</i>												
Meio	Clone	Número médio de tufos de brotações por explante/subcultivo									Média	
		Sub 1	Sub 2	Sub 3	Sub 4	Sub 5	Sub 6	Sub 7	Sub 8	Sub 9		
MS	C16	1,2 (0,8)*	3,0 (1,5)	3,1 (1,8)	2,7 (1,3)	4,5 (2,6)	4,7 (1,8)	4,5 (2,2)	3,4 (1,3)	3,6 (1,4)	3,4 (1,1)	
	C04	3,0 (1,0)	1,7 (0,9)	3,4 (1,2)	2,9 (1,4)	3,1 (1,1)	4,2 (1,7)	3,2 (1,2)	2,8 (1,1)	3,2 (1,1)	3,0 (0,7)	
	C17	1,2 (1,0)	1,3 (0,8)	1,8 (1,2)	4,0 (2,3)	1,9 (1,2)	2,2 (0,9)	4,0 (1,4)	5,0 (1,8)	2,8 (0,9)	2,7 (1,4)	
	C08	2,0 (2,0)	1,5 (0,6)	2,5 (2,3)	1,4 (1,4)	2,6 (1,2)	5,3 (2,4)	4,1 (1,6)	3,1 (1,2)	1,9 (0,9)	2,7 (1,3)	
	C01	1,0 (1,0)	1,8 (1,2)	1,2 (1,3)	5,1 (2,4)	2,5 (1,1)	4,1 (1,8)	3,5 (1,6)	2,2 (1,9)	2,4 (1,0)	2,6 (1,3)	
	C13	1,8 (1,0)	1,6 (0,8)	2,9 (1,2)	3,3 (1,4)	2,6 (1,3)	4,1 (1,5)	2,9 (1,3)	2,3 (0,7)	1,9 (0,7)	2,6 (0,8)	
	C18	0,8 (0,9)	2,2 (1,2)	1,6 (1,4)	1,1 (0,5)	1,6 (1,0)	2,7 (1,3)	1,9 (0,8)	2,1 (0,8)	2,1 (1,1)	1,8 (0,6)	
	C11	0,8 (0,5)	2,3 (0,6)	0,8 (0,4)	0,4 (0,5)	0,0	-	-	-	-	0,9 (0,9)	
	C20	1,0 (0,0)	1,0 (0,0)	0,7 (0,6)	1,0 (0,0)	0,0	-	-	-	-	0,7 (0,4)	
	C12	0,3 (0,8)	1,0 (0,0)	0,0	-	-	-	-	-	-	0,4 (0,5)	
	C15	0,0**	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0	
	JADS	C16	1,5 (1,0)	2,0 (0,9)	2,8 (1,3)	3,8 (2,3)	5,8 (2,0)	4,0 (1,8)	5,7 (1,4)	4,6 (2,0)	4,1 (1,1)	3,8 (1,5)
		C13	2,0 (0,8)	1,4 (0,5)	4,0 (1,9)	3,3 (0,9)	2,5 (0,8)	2,9 (0,9)	4,2 (1,3)	2,8 (1,0)	1,9 (0,6)	2,8 (1,0)
		C08	2,0 (0,0)	1,5 (1,3)	3,4 (2,7)	1,2 (1,2)	2,6 (1,5)	4,8 (2,2)	3,6 (2,0)	3,1 (1,4)	1,8 (1,0)	2,7 (1,2)
		C04	3,0 (1,0)	1,7 (1,2)	1,5 (0,9)	2,5 (1,1)	2,7 (1,2)	3,4 (1,3)	2,2 (1,1)	2,9 (1,3)	2,0 (1,1)	2,4 (0,6)
C01		1,0 (1,0)	2,1 (1,2)	1,3 (1,3)	3,3 (2,3)	2,8 (1,3)	2,0 (1,2)	3,2 (1,0)	3,3 (0,9)	2,2 (0,7)	2,3 (0,8)	
C17		1,4 (1,3)	1,7 (0,8)	2,3 (1,2)	2,9 (1,6)	2,1 (1,4)	2,0 (1,1)	2,2 (1,2)	3,1 (1,0)	2,0 (1,3)	2,2 (0,5)	
C11		1,3 (0,6)	1,5 (0,6)	1,0 (1,4)	1,2 (1,1)	1,8 (1,3)	0,7 (1,4)	1,4 (1,2)	3,2 (1,7)	2,7 (1,3)	1,6 (0,8)	
C18		0,8 (0,9)	1,2 (0,4)	1,6 (1,5)	1,1 (0,7)	1,5 (0,7)	1,3 (0,4)	1,7 (0,9)	2,3 (0,7)	2,1 (0,6)	1,5 (0,5)	
C20		1,0 (0,0)	1,0 (0,0)	1,0 (0,0)	1,7 (1,2)	0,0	-	-	-	-	0,9 (0,6)	
C12		0,2 (0,4)	1,0 (0,0)	0,0	-	-	-	-	-	-	0,4 (0,5)	
C15		0,0**	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0	
<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. globulus</i>												
Meio		Clone	Número médio de tufos de brotações por explante/subcultivo									Média
			Sub 1	Sub 2	Sub 3	Sub 4	Sub 5	Sub 6	Sub 7	Sub 8	Sub 9	
MS		C29	6,3 (2,5)	6,4 (4,3)	4,9 (2,5)	8,6 (2,1)	5,2 (2,7)	3,8 (1,6)	4,5 (2,8)	2,3 (1,3)	2,9 (1,4)	5,3 (1,9)
	C24	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0	
JADS	C29	3,3 (1,5)	3,7 (2,0)	5,7 (3,2)	6,8 (2,8)	4,5 (2,9)	6,7 (4,4)	6,5 (2,0)	3,2 (1,4)	4,9 (1,9)	5,1 (1,5)	
	C24	0,5 (0,8)	0,7 (1,2)	2,0 (0,0)	0,0	-	-	-	-	-	0,8 (0,9)	

\* Valores entre parênteses referem-se ao desvio padrão da média; \*\* Clone não utilizado na multiplicação *in vitro*; Sub = subcultivo.

Na comparação dos meios de cultura MS e JADS, observa-se que, em média, os dois meios tiveram efeitos aproximados, com tendência de melhores resultados no meio MS, principalmente na segunda e terceira introduções *in vitro* (Quadros 2, 3 e 4). Essa tendência também pode ser observada nos clones que tiveram apenas uma introdução *in vitro* (Quadro 5).

Em explantes juvenis de *Eucalyptus grandis*, ANDRADE et al. (2006) observaram, aos 21 dias, a produção média de sete brotações por explante em meio JADS com a exposição dos explantes por uma hora em 200 mg L<sup>-1</sup> de BAP, antes da inoculação no meio. CORREIA (1993) obteve alta produção de brotações aos 35 dias em cultura, na multiplicação de *Eucalyptus grandis*, em meio JADS com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, sendo os resultados superiores aos encontrados no presente estudo para o mesmo meio de cultura, demonstrando que melhores ajustes devem ser feitos para aumentar as taxas de multiplicação. Este mesmo autor comenta que o meio de cultura JADS possui uma composição nutricional de inorgânicos específica à espécie de *Eucalyptus grandis* que favorece um crescimento ótimo, podendo produzir *in vitro* até 150 mg de matéria seca/explante em cada 10 mL de meio de cultura.

Para *Eucalyptus tereticornis*, SHARMA e RAMAMURTHY (2000) verificaram bons resultados de proliferação de gemas em meio MS, contendo 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Da mesma forma, JOSHI et al. (2003) obtiveram de 20 a 25 gemas por explante, aos 150 dias em meio MS, contendo 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA para *Eucalyptus tereticornis* x *E. grandis*. BRONDANI (2008) ao trabalhar com a multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunii* em meio MS, adicionado de 0,4 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,04 mg L<sup>-1</sup> de ANA, obteve estimativas médias de até 13 gemas por explante para o melhor clone, sendo semelhante a alguns resultados obtidos no presente estudo.

De modo geral, cada clone respondeu de forma específica ao meio de cultura, observando-se diferenças no “ranking” dos clones do meio MS para o meio JADS, exceto para o clone C16, que foi superior aos demais clones, tanto no meio MS, quanto no meio JADS, nas três introduções *in vitro*. Nos clones com apenas uma introdução *in vitro*, essa mudança no “ranking” também ocorreu, exceto para os clones C03 e C07 de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*, assim como para os clones C26 e C27 de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*.

Quadro 3 – Número médio de tufos de brotações por explante dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* na segunda introdução *in vitro* nos meios de cultura MS e JADS em sucessivos subcultivos, após 30 dias em cultura.

<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. globulus</i>									
Meio	Clone	Número médio de tufos de brotações por explante/subcultivo							Média
		Sub 1	Sub 2	Sub 3	Sub 4	Sub 5	Sub 6	Sub 7	
MS	C16	1,6 (0,6)*	2,8 (1,7)	5,0 (3,0)	5,7 (2,4)	4,2 (2,7)	4,5 (1,2)	2,5 (0,9)	3,7 (1,5)
	C01	1,1 (0,6)	3,3 (1,6)	3,9 (2,2)	3,3 (1,5)	5,5 (1,8)	3,1 (1,1)	3,1 (1,0)	3,3 (1,3)
	C04	1,3 (0,6)	2,5 (1,9)	3,4 (1,8)	2,3 (1,0)	3,8 (2,3)	4,2 (1,6)	3,1 (1,2)	2,9 (1,0)
	C13	3,0 (1,0)	2,3 (1,0)	3,9 (1,0)	2,6 (1,4)	3,1 (1,4)	3,2 (1,0)	2,0 (0,8)	2,8 (0,6)
	C17	1,0 (0,0)	2,3 (2,1)	1,7 (1,1)	3,3 (1,1)	3,6 (1,6)	1,9 (0,8)	2,9 (0,8)	2,4 (0,9)
	C08	1,7 (0,6)	1,7 (1,2)	1,2 (2,2)	1,7 (0,5)	3,8 (1,2)	3,7 (0,8)	2,6 (0,8)	2,3 (1,0)
	C18	1,1 (0,3)	2,0 (1,8)	2,4 (0,9)	4,2 (1,7)	2,8 (1,7)	2,2 (1,0)	1,7 (0,8)	2,3 (1,0)
	C11	1,0 (0,0)	1,3 (1,5)	0,8 (1,3)	2,8 (3,0)	1,4 (0,5)	2,0 (1,2)	3,2 (1,3)	1,8 (0,9)
	C15	1,0 (1,0)	0,9 (0,9)	1,0 (1,2)	2,6 (1,3)	1,7 (0,9)	2,3 (0,9)	1,2 (0,4)	1,5 (0,7)
	C20	1,2 (0,4)	1,0 (0,6)	0,0	-	-	-	-	0,7 (0,6)
	C12	0,0**	-	-	-	-	-	-	0,0
JADS	C16	1,2 (0,5)	2,8 (1,8)	3,3 (0,6)	4,3 (1,6)	5,9 (2,2)	5,7 (1,4)	2,6 (1,1)	3,7 (1,7)
	C11	1,5 (1,0)	2,8 (1,8)	1,8 (1,4)	2,7 (1,6)	2,0 (0,7)	3,3 (1,5)	3,9 (1,3)	2,6 (0,9)
	C01	1,3 (0,6)	2,8 (1,6)	2,2 (0,8)	3,3 (1,8)	3,3 (1,7)	2,7 (1,2)	2,4 (1,2)	2,6 (0,7)
	C04	1,7 (1,2)	2,8 (2,6)	1,7 (0,8)	2,9 (1,1)	2,4 (1,1)	2,9 (1,3)	3,0 (1,4)	2,5 (0,6)
	C08	1,0 (0,0)	1,7 (0,6)	2,3 (4,0)	1,7 (1,3)	4,5 (2,3)	3,5 (0,9)	1,2 (0,4)	2,3 (1,3)
	C13	1,5 (1,0)	1,2 (0,4)	3,1 (0,9)	1,7 (1,6)	2,3 (1,2)	2,6 (1,0)	1,6 (0,6)	2,0 (0,7)
	C18	1,3 (1,5)	1,4 (0,5)	1,7 (0,9)	1,6 (0,8)	1,3 (0,6)	2,1 (1,2)	1,9 (1,0)	1,6 (0,3)
	C20	1,0 (0,0)	1,4 (0,8)	1,1 (0,3)	1,5 (0,8)	1,1 (0,2)	1,4 (0,7)	1,0 (0,6)	1,2 (0,2)
	C17	1,0 (0,0)	1,3 (0,6)	1,5 (1,3)	0,0	-	-	-	1,0 (0,7)
	C15	0,7 (0,5)	0,0	-	-	-	-	-	0,4 (0,5)
	C12	0,0**	-	-	-	-	-	-	0,0
<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. globulus</i>									
Meio	Clone	Número de tufos de brotações por explante/subcultivo							Média
		Sub 1	Sub 2	Sub 3	Sub 4	Sub 5	Sub 6	Sub 7	
MS	C24	1,0 (0,0)	0,3 (0,6)	0,0	-	-	-	-	0,4 (0,5)
	C29	0,0**	-	-	-	-	-	-	0,0
JADS	C24	1,1 (1,0)	1,0 (1,7)	0,0	-	-	-	-	0,7 (0,6)
	C29	0,0**	-	-	-	-	-	-	0,0

\* Valores entre parênteses referem-se ao desvio padrão da média; \*\* Clones não utilizados na multiplicação *in vitro*; Sub = subcultivo.

Quadro 4 – Número médio de tufos de brotações por explante de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* na terceira introdução *in vitro* nos meios de cultura MS e JADS em sucessivos subcultivos, após 30 dias em cultura.

<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. globulus</i>							
Meio	Clone	Número de tufos de brotações por explante/subcultivo					Média
		Sub 1	Sub 2	Sub 3	Sub 4	Sub 5	
MS	C16	3,5 (1,8)*	4,3 (1,5)	3,7 (2,4)	3,7 (1,3)	3,8 (1,5)	3,8 (0,3)
	C01	2,1 (1,5)	2,5 (1,9)	5,0 (2,1)	5,0 (2,3)	3,7 (1,4)	3,6 (1,3)
	C08	1,9 (0,7)	4,6 (1,7)	4,1 (1,6)	2,4 (0,8)	2,8 (1,0)	3,1 (1,2)
	C13	2,5 (1,7)	2,1 (1,0)	4,1 (1,8)	3,0 (0,9)	2,4 (0,8)	2,8 (0,8)
	C12	1,1 (0,6)	2,6 (2,5)	4,4 (2,6)	2,2 (1,2)	3,2 (1,2)	2,7 (1,2)
	C18	1,3 (0,6)	1,9 (0,8)	3,5 (1,4)	5,4 (1,9)	1,3 (0,6)	2,7 (1,8)
	C17	1,2 (0,5)	1,7 (0,7)	4,2 (2,1)	3,8 (1,1)	2,0 (0,9)	2,6 (1,3)
	C11	1,0 (0,0)	2,0 (1,7)	3,4 (2,3)	2,8 (1,7)	4,0 (1,6)	2,6 (1,2)
	C15	2,4 (1,3)	2,5 (0,9)	3,8 (2,3)	2,4 (1,0)	1,9 (0,7)	2,6 (0,7)
	C04	1,0 (0,0)	2,3 (0,6)	2,3 (0,6)	2,0 (0,6)	3,7 (1,3)	2,3 (1,0)
	C20	1,0 (0,0)	0,7 (0,5)	0,0	-	-	0,6 (0,5)
JADS	C08	1,7 (0,7)	2,8 (1,2)	4,9 (2,9)	3,0 (1,3)	2,9 (0,9)	3,0 (1,2)
	C17	1,3 (0,6)	2,0 (1,1)	3,0 (1,2)	4,2 (1,3)	2,6 (1,1)	2,6 (1,1)
	C13	1,5 (1,1)	1,6 (0,5)	4,6 (1,9)	2,7 (1,4)	2,3 (0,9)	2,5 (1,3)
	C12	1,0 (0,4)	1,0 (1,3)	3,7 (1,9)	2,0 (1,2)	3,2 (1,1)	2,1 (1,3)
	C18	1,2 (0,4)	1,4 (0,6)	3,3 (1,2)	2,2 (1,2)	1,4 (0,6)	1,9 (0,9)
	C15	1,4 (0,7)	1,3 (0,9)	1,8 (1,1)	1,5 (0,8)	1,1 (0,9)	1,4 (0,3)
	C20	1,0 (0,6)	1,4 (1,1)	1,1 (0,7)	1,0 (0,7)	1,1 (0,7)	1,2 (0,2)
	C11	0,8 (0,5)	0,3 (0,6)	0,0	-	-	0,4 (0,4)
	C01	0,0**	-	-	-	-	0,0
	C04	0,0**	-	-	-	-	0,0
	C16	0,0**	-	-	-	-	0,0
<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. globulus</i>							
Meio	Clone	Número de tufos de brotações por explante/subcultivo					Média
		Sub 1	Sub 2	Sub 3	Sub 4	Sub 5	
MS	C29	2,3 (1,7)	5,9 (3,5)	5,5 (1,6)	4,3 (2,3)	5,1 (2,0)	4,6 (1,4)
	C24	0,3 (0,5)	0,0	-	-	-	0,1 (0,2)
JADS	C29	1,4 (0,5)	5,7 (1,1)	4,7 (2,8)	5,4 (3,3)	6,1 (2,7)	4,7 (1,9)
	C24	0,5 (0,8)	0,0	-	-	-	0,3 (0,4)

\* Valores entre parênteses referem-se ao desvio padrão da média; \*\* Clones não utilizados na multiplicação *in vitro*; Sub = subcultivo.

Entre todos os clones estudados, o clone C29 (Figura 2A e 2B) foi o que apresentou as maiores taxas de multiplicação, tanto no meio de cultura JADS, quanto no meio MS (5,3 e 5,1, respectivamente). Entretanto, esse clone não se estabeleceu na segunda introdução *in vitro* (Quadro 3), devido ao baixo vigor e número de brotações produzidas na fase de estabelecimento nessa introdução. Variações entre genótipos também têm sido obtidas em alguns trabalhos quanto às taxas de multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus* (CORREIA, 1993; BENNETT et al., 1994; SOBROSA e CORDER, 2003; BRONDANI, 2008), demonstrando ser este um fator que exerce grande influência na resposta *in vitro*.



Quadro 5 – Número médio de tufos de brotações por explante dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* com apenas uma introdução *in vitro* nos meios de cultura MS e JADS em sucessivos subcultivos, após 30 dias em cultura.

<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. globulus</i>							
Meio	Clone	Número de tufos de brotações por explante/subcultivo					Média
		Sub 1	Sub 2	Sub 3	Sub 4	Sub 5	
MS	C03	6,5 (2,2)*	2,6 (1,1)	2,5 (1,3)	5,6 (1,4)	4,5 (0,9)	4,3 (1,8)
	C09	2,1 (1,4)	3,5 (2,1)	6,0 (2,4)	4,0 (1,7)	3,6 (1,5)	3,8 (1,4)
	C14	2,8 (1,4)	4,0 (1,4)	3,4 (1,5)	3,1 (2,2)	2,9 (1,4)	3,2 (0,5)
	C10	2,3 (1,2)	2,3 (1,4)	4,7 (2,1)	3,8 (1,6)	2,2 (0,9)	3,0 (1,2)
	C05	1,4 (0,7)	2,1 (1,8)	4,8 (2,4)	3,0 (1,9)	3,4 (1,4)	2,9 (1,3)
	C02	1,8 (0,9)	3,6 (1,3)	3,7 (1,6)	3,3 (1,9)	1,1 (0,2)	2,7 (1,2)
	C06	1,4 (1,0)	3,0 (1,5)	4,5 (2,0)	2,3 (0,9)	2,1 (0,9)	2,6 (1,2)
	C22	3,7 (2,1)	1,8 (1,0)	1,6 (0,8)	1,6 (0,9)	1,3 (0,8)	2,0 (0,9)
	C19	1,0 (0,7)	0,8 (0,4)	1,3 (0,5)	2,8 (1,8)	2,9 (0,8)	1,8 (1,0)
C07	0,8 (0,5)	1,5 (0,6)	1,2 (0,4)	1,4 (0,9)	2,1 (1,1)	1,4 (0,5)	
JADS	C03	3,6 (1,8)	1,8 (2,0)	2,8 (1,4)	5,7 (1,6)	3,7 (1,3)	3,5 (1,4)
	C02	2,1 (0,8)	4,1 (2,4)	3,2 (1,5)	4,5 (2,1)	2,2 (1,2)	3,2 (1,1)
	C06	1,4 (1,4)	2,3 (1,4)	3,9 (1,9)	2,9 (2,0)	2,7 (1,7)	2,6 (0,9)
	C14	1,3 (0,5)	2,1 (1,5)	2,3 (1,1)	4,1 (1,8)	3,2 (1,5)	2,6 (1,1)
	C05	1,1 (0,3)	1,1 (1,2)	3,6 (3,4)	2,6 (1,4)	3,8 (2,1)	2,4 (1,3)
	C09	1,4 (0,9)	0,9 (0,3)	2,0 (1,3)	4,2 (2,1)	3,8 (2,1)	2,4 (1,5)
	C19	1,0 (0,0)	1,2 (0,4)	1,2 (0,4)	4,3 (3,3)	3,7 (1,8)	2,3 (1,6)
	C10	1,3 (0,9)	0,5 (1,0)	2,2 (1,0)	3,3 (2,5)	2,4 (1,2)	1,9 (1,1)
	C22	2,0 (0,0)	1,0 (1,0)	2,0 (0,0)	1,5 (0,6)	0,3 (0,5)	1,4 (0,7)
C07	1,0 (0,0)	1,0 (0,0)	1,3 (0,6)	2,0 (1,0)	1,3 (0,5)	1,3 (0,4)	
<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. globulus</i>							
Meio	Clone	Número de tufos de brotações por explante/subcultivo					Média
		Sub 1	Sub 2	Sub 3	Sub 4	Sub 5	
MS	C26	2,0 (0,8)	5,0 (1,7)	3,8 (1,5)	5,8 (1,3)	4,5 (1,5)	4,2 (1,4)
	C23	0,9 (1,6)	2,8 (2,0)	4,7 (1,7)	3,7 (2,0)	2,5 (0,8)	2,9 (1,4)
	C30	1,5 (1,1)	2,6 (1,4)	4,7 (2,4)	3,6 (1,5)	2,3 (0,9)	2,9 (1,2)
	C27	1,0 (0,6)	2,6 (1,0)	1,7 (1,1)	1,6 (0,8)	1,5 (1,0)	1,7 (0,6)
JADS	C26	1,3 (0,5)	1,0 (0,7)	3,2 (1,5)	5,9 (1,3)	5,3 (1,6)	3,3 (2,2)
	C30	1,2 (0,7)	2,0 (0,9)	4,3 (2,2)	3,8 (1,9)	2,5 (1,2)	2,7 (1,3)
	C23	1,1 (0,9)	1,7 (1,1)	4,2 (2,7)	2,0 (1,3)	2,1 (0,9)	2,2 (1,2)
	C27	1,1 (0,4)	1,0 (0,8)	1,4 (0,7)	1,6 (0,9)	2,1 (1,1)	1,5 (0,4)

\* Valores entre parênteses referem-se ao desvio padrão da média; Sub = subcultivo.

Alguns clones se mostraram recalcitrantes em relação aos demais durante a fase de multiplicação em pelo menos uma das introduções *in vitro*, sendo descartados após alguns subcultivos (clones C11, C12, C15, C20 e C24), ressaltando que o clone C20 (Figura 2C e 2D) não se estabeleceu no meio de cultura MS e o clone C24 não se estabeleceu em nenhum dos dois meios. Estes clones apresentavam-se sem vigor e necróticos, o que limitou seu cultivo. BRONDANI (2008) também observou recalcitrância na fase de multiplicação *in vitro* de um clone de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunii*, sendo causada pelo elevado índice de oxidação durante a proliferação das gemas. Isto evidencia a necessidade de ajustes nos protocolos de multiplicação *in vitro* para determinados genótipos que não se adaptaram às condições de cultivo.

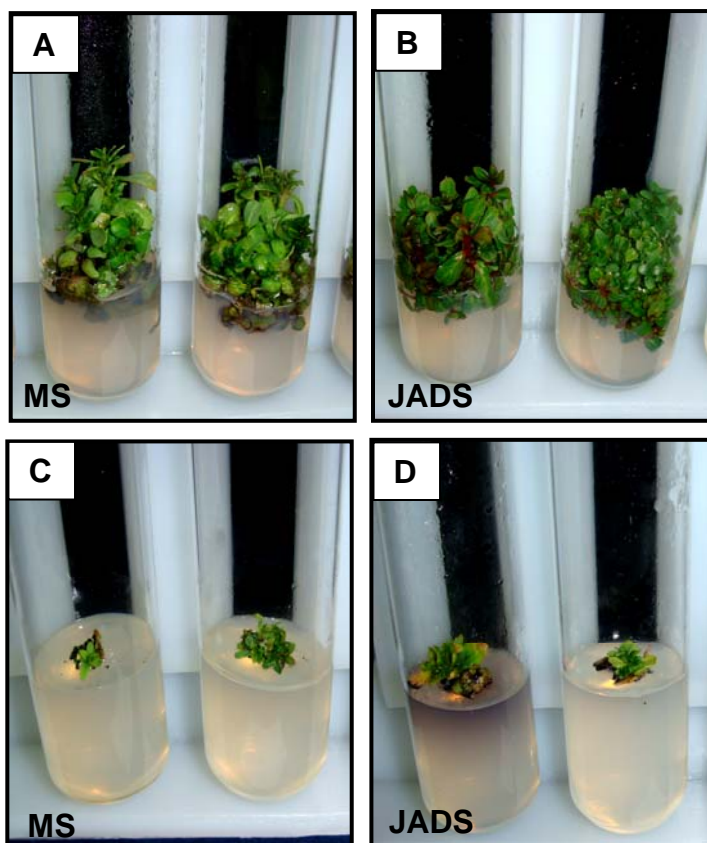


Figura 2 - Gemas de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* após 30 dias em meio de multiplicação JADS e MS, no quarto subcultivo. A e B: Clone C29 evidenciando alta taxa de multiplicação em meio de cultura MS e JADS; C e D: Clone C20 recalcitrante na fase de multiplicação *in vitro* nos meios MS e JADS. Diâmetro do tubo de ensaio = 2,5 cm.

De modo geral, no meio de cultura MS, observou-se que as brotações apresentavam-se mais alongadas e com folhas maiores do que no meio JADS (Figura 3A e 3B). Também foi observada no meio MS a ocorrência, em baixa frequência, de alguns explantes hiperídricos em alguns clones, não sendo observado esse comportamento no meio JADS. Segundo WHITEHOUSE et al. (2002) a hiperidricidade é frequentemente relatada na micropropagação de espécies lenhosas, podendo reduzir as taxas de multiplicação e a qualidade das brotações e levar a necrose dos tecidos. No entanto, no presente estudo, a hiperidricidade não afetou decisivamente a taxa de multiplicação dos clones, exceto no clone C29, a partir do sexto subcultivo na primeira introdução *in vitro*, onde a hiperidricidade ocorreu em maior frequência.

No meio JADS, foi observada tendência de escurecimento do meio na maioria dos clones (Figura 3D), evidenciando a oxidação de compostos fenólicos liberados pelo

explante para o meio de cultura, principalmente após 20 dias em cultura. No meio MS esse escurecimento foi baixo, ocorrendo somente em alguns explantes (Figura 3C).

A taxa de multiplicação mostrou tendência de aumento com os sucessivos subcultivos, porém decaindo, posteriormente, na maioria dos clones para as três introduções *in vitro*, assim como nos clones com apenas uma introdução. BENNET et al. (1994) observaram que clones de *Eucalyptus globulus* apresentaram bom crescimento inicial em meio de cultura contendo BAP, mas esse crescimento declinou após o terceiro ou quarto subcultivo. Quando os mesmos autores usaram BAP e Cinetina no meio de cultura, em subcultivos alternados, houve uma melhoria na taxa de multiplicação *in vitro* dos clones. Já no presente estudo, os subcultivos contínuos na mesma composição de meio de cultura podem ser uma das causas do declínio na taxa de multiplicação, devido à falta de ajuste dos meios para alguns clones. Sendo assim, a alternância dos subcultivos em meio de cultura com diferentes tipos ou doses de reguladores, ou mesmo a alternância entre meios com diferentes composições salinas (JADS e MS), poderia melhorar ou manter as taxas de multiplicação dos clones, sendo este um ponto que merece maiores estudos para ajustes na micropropagação dos híbridos de *Eucalyptus globulus*.

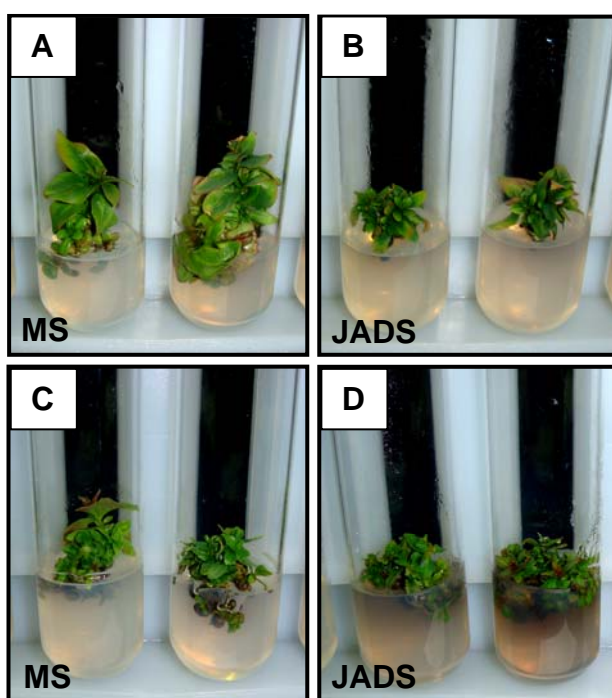


Figura 3 – Gemas de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* após 30 dias em meio de multiplicação JADS e MS, no nono subcultivo. A e B: Clone C04 evidenciando brotações mais alongadas e maior tamanho de folhas no meio de cultura MS em relação ao meio JADS; C e D: Clone C08 evidenciando o escurecimento do meio de cultura JADS em relação ao meio MS. Diâmetro do tubo de ensaio = 2,5 cm.

Nos primeiros subcultivos (Subcultivos 1, 2 e 3), observou-se a formação de estruturas semelhantes a calos de coloração esbranquiçada na face abaxial das folhas de alguns clones estudados (Figura 4A e 4B). Após o terceiro ou quarto subcultivo, essas estruturas desapareceram ou ocorreram em baixa frequência. QUISEN (2007) também observou a ocorrência dessas estruturas durante a fase de multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus camaldulensis*, destacando que elas ocorreram em brotações individualizadas de determinados clones, subcultivadas após permanecerem mais de 30 dias em cultura. GASPAR et al. (2002) associam o aparecimento de calos em culturas *in vitro* a existência de estresse em nível celular, seja pela umidade no ambiente, assim como também em resposta às mudanças no metabolismo e desenvolvimento da cultura. Isso poderia explicar a ocorrência dessas estruturas no presente estudo, uma vez que elas apareceram com maior frequência nos primeiros subcultivos, quando as plantas estariam passando por um processo de adaptação às condições *in vitro*.

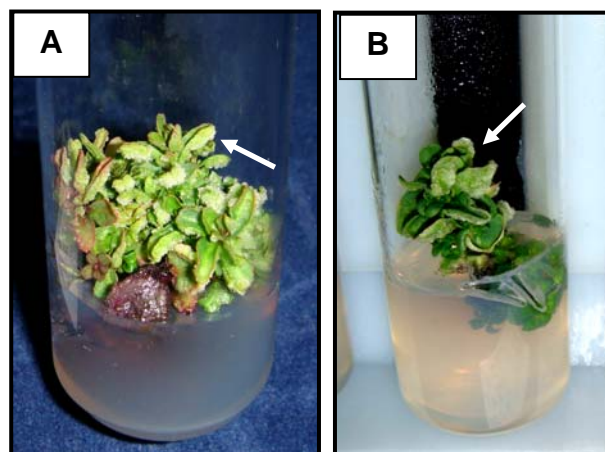


Figura 4 – Presença de calos (setas) na superfície abaxial das folhas de brotos de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, no terceiro subcultivo. A: Clone C29; B: Clone C03. Diâmetro do tubo de ensaio = 2,5 cm.

Foi observado, visualmente, que nos 12 primeiros dias após a inoculação, em cada subcultivo, os explantes apresentavam crescimento lento, iniciando o processo de proliferação das gemas axilares a partir desse período. A proliferação era rápida até o 20º dia em cultura, quando então o crescimento se estabilizava. Em alguns clones, observou-se que após o 25º dia, se iniciava uma queda do vigor vegetativo das gemas formadas (folhas amareladas, formação de calo na base do explante com necrose de folhas em contato com o meio de cultura), evidenciando que o intervalo entre subcultivos para esses clones

deveria ser inferior a esse período. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por ANDRADE et al. (2006) que também obtiveram a maior produção de brotações de *Eucalyptus grandis* entre o 14º e o 21º dia após a inoculação *in vitro*. CORREIA (1993) também observou perda do vigor de gemas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* após 30 dias, cultivadas em meio JADS.

#### 4. CONCLUSÕES

- Os meios de cultura MS e JADS tiveram efeitos positivos na multiplicação dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, com tendência de melhores resultados para o meio MS na segunda e terceira introdução *in vitro*.
- A taxa de multiplicação variou entre subcultivos, apresentando tendência de aumento inicial e posterior queda para a maioria dos clones e introduções *in vitro*.
- Houve respostas diferenciadas quanto à taxa de multiplicação, com clones apresentando boas taxas de multiplicação *in vitro* e alguns clones recalcitrantes à micropropagação.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. 442 p.

ANDRADE, W. F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A. N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, 2006.

ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema, 2007. p. 93-121.

BENNETT, I. J.; McCOMB, J. A.; TONKINI, C. M.; McDAVID, D. A. J. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. **Annals of Botany**, v. 74, p. 53-58, 1994.

BILLARD, C. E.; LALLANA, V. H. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*. **Ciencia, Docencia y Tecnología**, n. 30, p. 199-216, 2005.

BRAVO, C. D. V.; GONÇALVES, A. N.; DIAS, C. T. S.; VENCOVSKY, R. Controle genético da regeneração *in vitro* em progênies de *Eucalyptus grandis*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2181-2185, 2008.

BRONDANI, G. E. **Miniestaquia e micropropagação de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2008. 118 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E.. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.

CARDOSO, G. V. **Otimização do cozimento kraft para produção de celulose a partir de madeiras de *Eucalyptus globulus* com diferentes teores de lignina**. 2002. 147 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

CORREIA, D. **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação *Eucalyptus* spp. *in vitro* em meio de cultura líquido e sólido**. 1993. 113 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba.

DEL PONTE, E. M.; MATTEI, V. L.; PETERS, J. A. ASSIS, T. F. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus* Labill. **Revista Árvore**, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2001.

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C. E.; VAN WYK, G. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1993. 288 p.

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J. F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology: application to plant tissues cultures. **Plant Growth Regulation**, v. 37, n. 3, p. 263-285, 2002. ,

GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G.-J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, p. 29-64.

GOMES, F.; CANHOTO, J. M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (Shining gum). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 39, p. 316-321, 2003.

GLOCKE, P.; DELAPORTE, K.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema* x *Eucalyptus stricklandii* cv. ‘Urrbrae Gem’. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 42, p. 139-143, 2006.

GRAÇA, M. E. C.; KALIL FILHO, A. N.; MEDEIROS, A. C. S.; TAVARES, F. R. Efeitos das citocininas benzilamino purina e thidiazuron na multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus dunnii* Maid. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 43, p. 107-112, 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T. GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880 p.

- JOSHI, I.; BISHT, P.; SHARMA, V. K.; UNIYAL, D. P. In vitro clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. x *E. grandis* Hill ex. Maiden). **Silvae Genetica**, v. 52, n. 3/4, p. 110-113, 2003.
- KAPOOR, M. L.; CHAUHAN, J. M. S. In vitro clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*E. torelliana* F. V. Muell x *E. citriodora* Hook). **Silvae Genetica**, v. 41, n. 6, p. 305-307, 1992.
- LIMA, M. M.; GONÇALVES, A. N. Efeito do Thidiazuron na multiplicação *in vitro* de gemas de um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis*. **Scientia Forestalis**, n. 53, p. 49-56, 1998.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NUGENT, G.; CHANDLER, S. F.; WHITEMAN, P.; STEVENSON, T. W. Adventitious bud induction in *Eucalyptus globulus* Labill. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 37, p. 388-391, 2001.
- QUISEN, R. C. **Transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens***. 2007. 125 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- ROSA, C. A. B. **Influência do teor de lignina da madeira de *Eucalyptus globulus* na produção e na qualidade da celulose Kraft**. 2003. 140 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- SANTOS, D. C.; WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; FRACARO, L. C. **Alongamento *in vitro* de *Eucalyptus urophylla***. Colombo: CNPF/EMBRAPA, 2004. 4 p. (Comunicado Técnico, 120)
- SHARMA, S. K.; RAMAMURTHY, V. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 511-518, 2000.
- SOBROSA, R. C.; CORDER, M. P. M. Efeito do genótipo sobre o potencial para produção de gemas e raízes adventícias em *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden *in vitro*. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 1, p. 58-68, 2003
- WATT, M. P.; BERJAK, P.; MAKHATHINI, A.; BLAKEWAY, F. In vitro field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 233-240, 2003.
- WHITEHOUSE, A. B.; MARKS, T. R.; EDWARDS, G. A. Control of hyperhydricity in *Eucalyptus* axillary shoot cultures grown in liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 71, p. 245-252, 2002.
- XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BOREM, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: Suprema, 2007b. p. 55-74.
- XAVIER, A. A.; SANFUENTES, E. V.; JUNGHANS, D. T.; ALFENAS, A. C. Resistência de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens* à ferrugem (*Puccinia psidii*). **Revista Árvore**, v. 31, n. 4, p. 731-735, 2007a.

YANG, J.-C.; CHUNG, J.-D.; CHEN, Z.-Z. Vegetative propagation of adult *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* and comparison of growth between micropropagated plantlets and rooted cuttings. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 170-173, 1995.



## **ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE CLONES HÍBRIDOS DE *Eucalyptus globulus***

**RESUMO:** O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do regulador de crescimento AIB no enraizamento de miniestacas apicais e intermediárias de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*. As miniestacas foram coletadas em minijardim clonal conduzido sob sistema semi-hidropônico de canaletão de areia. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 3 x 11, constituído de dois tipos de miniestacas (apicais e intermediárias), três doses de AIB (0, 2000 e 4000 mg L<sup>-1</sup>) e onze clones, em três repetições, compostas de parcelas com 12 miniestacas por repetição. Os resultados obtidos de sobrevivência na casa de vegetação e enraizamento e sobrevivência na casa de sombra permitiram concluir que não houve efeito do AIB, as miniestacas apicais apresentaram melhores resultados e que houve variabilidade de respostas ao enraizamento dos clones avaliados.

**Palavras-chave:** Propagação clonal, miniestaquia, ácido indolbutírico.

## **ROOTING OF MINI-CUTTINGS OF HYBRID CLONES OF *Eucalyptus globulus***

**ABSTRACT:** The present study aimed to evaluate the effect of the growth regulator IBA on the rooting of apical and intermediary mini-cuttings of *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* and *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* clones. The mini-cuttings were collected in clonal mini-stumps cultured on a semi-hydroponic sand bed system. The experimental delineation used was in random blocks in a 2 x 3 x 11 factorial arrangement constituted by two types of mini-cuttings (apical and intermediary), three doses of IBA (0, 2000 and 4000 mg L<sup>-1</sup>) and eleven clones, in three repetitions composed of 12 mini-cuttings per repetition. The obtained results of survival in the greenhouse and rooting and survival in the shade house allowed the conclusions that there was no effect from the IBA, the apical mini-cuttings presented better results and that there was variability in the rooting responses of the evaluated clones.

**Keywords:** Clonal propagation, mini-cuttings, indole butyric acid.

## 1. INTRODUÇÃO

A propagação vegetativa tem se tornado uma importante ferramenta para aumentar a competitividade das indústrias de base florestal, alcançando seu maior potencial quando está atrelado aos programas de melhoramento genético, estabelecendo florestas clonais de híbridos com maior produtividade e melhor qualidade da madeira. No entanto, algumas espécies e clones, particularmente em *Eucalyptus*, tem apresentado dificuldades no processo de produção de mudas pelo enraizamento de estacas, dificultando o aproveitamento dos benefícios da clonagem.

A clonagem de *Eucalyptus* no Brasil passou por inúmeras transformações tendo iniciado com a técnica de estaquia, implementada em escala comercial no final da década de 70 (ALFENAS et al., 2004). Devido às dificuldades de enraizamento encontradas em algumas espécies e clones na propagação por estaquia, principalmente no que envolve material adulto, foram desenvolvidas as técnicas de miniestaquia (XAVIER e WENDLING, 1998; WENDLING, 1999; HIGASHI et al., 2000) e de microestaquia (ASSIS et al., 1992; XAVIER e COMÉRIO, 1996), possibilitando consideráveis ganhos, principalmente, quanto ao aumento das taxas e qualidade de enraizamento e redução do tempo para a formação da muda.

A formação de raízes em estacas é um processo anatômico e fisiológico complexo, associado à desdiferenciação e ao redirecionamento do desenvolvimento de células vegetais totipotentes para a formação de meristemas que darão origem a raízes adventícias. O enraizamento de estacas pode ser influenciado por injúrias, pelo balanço hormonal, pela constituição genética, pela presença de inibidores e pelas condições nutricionais e hídricas da planta doadora de propágulos (ALFENAS et al., 2004; ASSIS et al., 2004), além de ser fortemente influenciado pela maturação/juvenildade dos propágulos e pelas condições ambientais de enraizamento de estacas (WENDLING et al., 2000a; XAVIER, 2002).

Em certas condições, a aplicação de substâncias promotoras do enraizamento pode gerar melhores resultados na propagação vegetativa das plantas, sendo as auxinas naturais e sintéticas o grupo de substâncias de maior interesse no processo de enraizamento adventício de estacas. Aplicações de auxinas proporcionam maior percentagem, velocidade, qualidade e uniformidade de enraizamento (HARTMANN et al., 2002). No entanto, o efeito sobre a resposta rizogênica das espécies e clones depende do tipo, concentração e forma de aplicação da auxina (ASSIS et al., 2004). Em *Eucalyptus*, o ácido

indolbutírico tem sido a auxina mais usada com a finalidade de melhorar o enraizamento de estacas (WENDLING et al., 2000b; XAVIER et al., 2001; SOUZA JUNIOR e WENDLING, 2003; WENDLING e XAVIER, 2005; ALMEIDA, 2006; GOULART, 2007; BRONDANI, 2008).

O *Eucalyptus globulus* tem se mostrado como uma das espécies recalcitrantes ao enraizamento de estacas, com índices de enraizamento que variam de 5 a 90 % (Sasse, 1995, citado por DEL PONTE, 2001), e com apenas 1 a 2 % das árvores-elite selecionadas apresentando enraizamento médio igual ou superior a 60 % (ALFENAS et al., 2004). No entanto, atualmente essa espécie tem sido alvo de grande interesse da indústria de papel e celulose por possuir a madeira com excelentes características físicas, químicas e anatômicas para tal objetivo (CARDOSO, 2002; ROSA, 2003; ALFENAS et al., 2004; XAVIER et al., 2007). Em regiões tropicais, as empresas têm optado pela hibridação do *Eucalyptus globulus* com outras espécies do gênero *Eucalyptus*, visando melhorar a adaptação da espécie às condições ambientais e a maior facilidade de propagação vegetativa, dentre outras vantagens (ASSIS e MAFIA, 2007).

A carência de estudos com espécies recalcitrantes ao enraizamento de estacas, como o *Eucalyptus globulus* (ALFENAS et al., 2004), e também de estudos sobre o processo de enraizamento dos atuais híbridos dessa espécie, tem incentivado o desenvolvimento de pesquisas que viabilizem a propagação clonal desses genótipos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivos avaliar o efeito do regulador de crescimento AIB no enraizamento de miniestacas apicais e intermediárias de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, avaliando o potencial da miniestaquia na propagação clonal desses híbridos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material experimental**

Os experimentos foram conduzidos no Viveiro de Pesquisas Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa – UFV, localizado no município de Viçosa, Minas Gerais. O clima dessa região é do tipo Cwb (verões chuvosos e invernos frios e secos), segundo a classificação de Köppen, com

latitude 20°45'S, longitude 42°55'W e altitude média de 648 m. A precipitação média anual é de 1.221,4 mm e a temperatura média anual é de 19,4 °C, com máxima média de 26,4 °C e mínima média de 14,8 °C.

Foram utilizados propágulos vegetativos de minicepas de nove clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C01, C04, C07, C08, C12, C14, C16, C17 e C19) e dois clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C24 e C29), oriundos da empresa Cenibra, localizada no município de Belo Oriente, Minas Gerais. Os clones utilizados nos experimentos são resultado do programa de melhoramento genético da empresa Cenibra e foram gerados a partir de cruzamentos utilizando polens de *Eucalyptus globulus*, provenientes do Instituto Raiz em Portugal, e como genitores femininos, matrizes superiores de *Eucalyptus grandis* ou *Eucalyptus urophylla* da própria empresa (Quadro 1).

Quadro 1 – Clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* e seus genitores femininos e masculinos.

Clones	Genitor Feminino	Genitor Masculino
	<i>Eucalyptus urophylla</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>
C01	U03	G02
C04	U09	G07
C07	U09	G06
C08	U05	G06
C12	U08	G09
C14	U06	G10
C16	U14	G07
C17	U13	G08
C19	U12	G02
	<i>Eucalyptus grandis</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>
C24	M16	G04
C29	M18	G02

Os clones foram selecionados em testes de progênie híbrida avaliando-se as características silviculturais (DAP, altura, forma, dentre outras) aos três anos de idade. Nesta idade, foram produzidas mudas pelo processo de estaquia convencional para multiplicação do material vegetativo, as quais foram conduzidas como minicepas em minijardim clonal, sob sistema semi-hidropônico de canaletão de areia, no Viveiro de Pesquisas Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa.

## **2.2. Manejo do minijardim clonal**

Conforme a técnica de miniestaquia (XAVIER e WENDLING, 1998; HIGASHI et al., 2000; ALFENAS et al., 2004; ASSIS et al., 2004), as minicepas foram obtidas pelo enraizamento de estacas coletadas de brotações de cepas de árvores matrizes decepadas em campo. As mudas, com aproximadamente 120 dias e altura de 25 cm, foram plantadas no espaçamento de 10 cm x 10 cm em minijardim clonal sob sistema semi-hidropônico de canaletão de areia, em casa de vegetação com as laterais abertas e coberta com plástico transparente de polietileno. Após 20 dias, procedeu-se a poda do ápice das mudas a uma altura de 10 cm da base para formação das minicepas.

As plantas receberam solução nutritiva por gotejamento, aplicada quatro vezes ao dia, numa vazão total diária de 4 L m<sup>-2</sup>. A solução nutritiva foi composta de nitrato de cálcio (0,920 g L<sup>-1</sup>), cloreto de potássio (0,240 g L<sup>-1</sup>), nitrato de potássio (0,140 g L<sup>-1</sup>), monoamônio fosfato (0,096 g L<sup>-1</sup>), sulfato de magnésio (0,364 g L<sup>-1</sup>), hidróferro (0,040 g L<sup>-1</sup>), ácido bórico (2,800 mg L<sup>-1</sup>), sulfato de zinco (0,480 mg L<sup>-1</sup>), sulfato de manganês (1,120 mg L<sup>-1</sup>), sulfato de cobre (0,100 mg L<sup>-1</sup>) e molibdato de sódio (0,040 mg L<sup>-1</sup>). A condutividade elétrica da solução nutritiva foi mantida em 2,0 mS m<sup>-2</sup> a 25 °C.

## **2.3. Coleta, preparo e estaqueamento das miniestacas**

Miniestacas apicais e intermediárias (Figura 1) foram coletadas no minijardim clonal e acondicionadas em caixas de isopor contendo água para manter as condições de turgescência do material vegetativo. As miniestacas apicais foram preparadas com dimensões variando de 5 a 7 cm contendo de dois a três pares de folhas e as miniestacas intermediárias medindo de 3 a 5 cm com um par de folhas, sendo as folhas reduzidas à metade de sua dimensão original. As miniestacas denominadas intermediárias foram obtidas da base do ramo que deu origem a miniestaca apical.

Após o preparo das miniestacas apicais e intermediárias, estas foram tratadas com o regulador de crescimento AIB (ácido indolbutírico – Sigma Co.) nas concentrações de 0, 2000 e 4000 mg L<sup>-1</sup>, na formulação líquida, dissolvido em hidróxido de potássio (KOH) a 1 mol L<sup>-1</sup> e diluídos em água desionizada. As miniestacas tiveram suas bases (1 cm) mergulhadas na solução de AIB por um período de 10 segundos, antes de serem

estaqueadas no substrato. O período compreendido entre a coleta das miniestacas e o estaqueamento no substrato, na casa de vegetação, foi sempre inferior a 30 minutos.

No enraizamento das miniestacas, utilizaram-se como recipientes tubetes plásticos de 55 cm<sup>3</sup> de capacidade, contendo substrato constituído de casca de arroz carbonizada (50 %) e vermiculita de granulometria média (50 %). A nutrição mineral utilizada no substrato foi composta de superfosfato simples (8,00 kg m<sup>-3</sup>), sulfato de amônio (0,69 kg m<sup>-3</sup>), cloreto de potássio (0,21 kg m<sup>-3</sup>), sulfato de zinco (13,9 g m<sup>-3</sup>), sulfato de cobre (13,9 g m<sup>-3</sup>), sulfato de manganês (13,9 g m<sup>-3</sup>) e ácido bórico (27,8 g m<sup>-3</sup>).

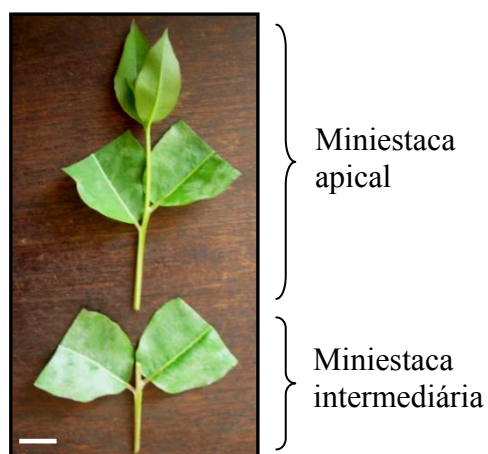


Figura 1 - Miniestaca apical e intermediária de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*, usadas como padrão no presente estudo. Barra = 1 cm.

Após o estaqueamento no substrato, o enraizamento das miniestacas foi conduzido em casa de vegetação climatizada (umidade relativa do ar  $\geq 80$  % e temperatura entre 20 e 30 °C) com permanência de 30 dias. Posteriormente, as miniestacas foram transferidas para casa de sombra coberta com sombrite 50 %, permanecendo por 10 dias.

#### 2.4. Condução e avaliações experimentais

O experimento foi conduzido no delineamento em blocos ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 3 x 11, constituído de dois tipos de miniestacas (apicais e intermediárias), três doses de AIB (0, 2000 e 4000 mg L<sup>-1</sup>) e onze clones (C01, C04, C07, C08, C12, C14, C16, C17, C19, C24 e C29), em três repetições, compostas de parcelas com 12 miniestacas por repetição.

As características avaliadas, aos 30 dias de idade, foram a porcentagem de sobrevivência e a porcentagem de miniestacas com emissão de raízes no fundo do tubete,

na saída da casa de vegetação. E na saída da casa de sombra (40 dias de idade), foram avaliadas: a porcentagem de sobrevivência; porcentagem de enraizamento; porcentagem de miniestacas com emissão de raízes no fundo do tubete; e o número de raízes por estaca enraizada.

Para efeito das avaliações, foram consideradas enraizadas as miniestacas com raízes maiores ou iguais a 0,5 cm; miniestacas vivas, aquelas com coloração verde e emitindo brotações e; para a contagem do número de raízes, foram consideradas as raízes emitidas diretamente das miniestacas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey, utilizando-se o programa computacional Sisvar (FERREIRA, 2000).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados da análise de variância, observou-se efeito significativo pelo teste F ( $p < 0,01$ ) da interação “clone x miniestaca” para as características avaliadas, exceto para sobrevivência na saída da casa de vegetação (Quadro 2). Não houve diferença estatística ( $p < 0,01$ ) na interação “clone x AIB”, “miniestaca x AIB” e “clone x miniestaca x AIB”, em todas as características estudadas. Os coeficientes de variação experimental apresentaram valores entre 5,6 e 41,9 %, sendo estes valores próximos aos encontrados na literatura para miniestaquia de *Eucalyptus* (XAVIER et al., 2001; ALMEIDA, 2006; GOULART, 2007; BRONDANI, 2008), indicando razoável precisão experimental.

Não foi observado efeito do regulador de crescimento AIB, nas concentrações testadas, para as características em estudo. Devido a esse fato, para gerar as médias e aplicar o teste Tukey às características avaliadas, foram utilizados os dados do tratamento sem AIB, diante da aplicabilidade nas condições operacionais.

A sobrevivência das miniestacas na saída da casa de vegetação (Figura 2A) foi alta para todos os clones (superior a 91 %) não havendo diferenças estatísticas entre os tratamentos, evidenciando um adequado controle das condições ambientais (temperatura e umidade) na casa de vegetação. Quanto à sobrevivência na saída da casa de sombra (Figura 2B), de modo geral esta também apresentou valores altos nas miniestacas apicais (maiores que 86 %). No entanto, houve uma ligeira redução no índice de sobrevivência das

Quadro 2 – Resultado da análise de variância para as características de sobrevivência (SOBCV) e emissão de raízes no fundo do tubete (EFTCV) na saída da casa de vegetação, sobrevivência (SOBCS), enraizamento (ECS), emissão de raízes no fundo do tubete (EFTCS) e número de raízes/miniéstaca enraizada (NRCS) na saída da casa de sombra, em miniéstacas apicais e intermediárias de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, em função das concentrações do regulador de crescimento AIB.

Fontes de Variação	GL	Quadrados médios					
		SOBCV (%)	EFTCV (%)	SOBCS (%)	ECS (%)	EFTCS (%)	NRCS (n°)
Clone (C)	10	72,00 <sup>ns</sup>	4119,20*	664,00*	3577,50*	3817,10*	16,31*
Miniéstaca (M)	1	28,00 <sup>ns</sup>	58383,80*	4167,00*	33705,10*	53072,70*	67,33*
AIB (A)	2	28,00 <sup>ns</sup>	347,60 <sup>ns</sup>	159,00 <sup>ns</sup>	191,80 <sup>ns</sup>	297,10 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>
C*M	10	57,00 <sup>ns</sup>	1210,20*	440,00*	1415,80*	1413,80*	5,94*
C*A	20	17,00 <sup>ns</sup>	236,10 <sup>ns</sup>	86,00 <sup>ns</sup>	122,00 <sup>ns</sup>	193,30 <sup>ns</sup>	0,29 <sup>ns</sup>
M*A	2	26,00 <sup>ns</sup>	114,70 <sup>ns</sup>	45,00 <sup>ns</sup>	368,60 <sup>ns</sup>	59,30 <sup>ns</sup>	1,24 <sup>ns</sup>
C*M*A	20	31,00 <sup>ns</sup>	183,00 <sup>ns</sup>	133,00 <sup>ns</sup>	494,80 <sup>ns</sup>	345,90 <sup>ns</sup>	0,19 <sup>ns</sup>
Bloco	2	232,00*	480,10 <sup>ns</sup>	418,00 <sup>ns</sup>	625,40 <sup>ns</sup>	804,20 <sup>ns</sup>	0,42 <sup>ns</sup>
Resíduo	130	30,00	370,50	109,00	234,00	292,50	0,30
Média Geral	-	97,3	45,9	89,0	69,0	60,6	2,5
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	5,6	41,9	11,7	22,2	28,2	21,9

“\*” e “<sup>ns</sup>” = significativo e não significativo, respectivamente, a 1% de probabilidade pelo teste F.

CV<sub>exp</sub> = Coeficiente de variação experimental.

miniéstacas intermediárias, principalmente no clone C12 (52,8 %), o qual diferiu significativamente das miniéstacas apicais e também dos demais clones.

A emissão de raízes no fundo do tubete foi maior nas miniéstacas apicais em relação às intermediárias para todos os clones estudados, tanto na saída da casa de vegetação, quanto na saída da casa de sombra, com variação entre clones (Figura 3A e 3B). Este critério tem sido muito utilizado pelas empresas florestais como indicador prático para identificar as miniéstacas enraizadas e aptas a serem transferidas para a área de crescimento em pleno sol. Vale destacar que o clone C12, nas miniéstacas apicais, apresentou alto índice de emissão de raízes no fundo do tubete (97,2 %) já na saída da casa de vegetação, chegando a 100 % na saída da casa de sombra. No entanto, as miniéstacas intermediárias apresentaram resultados muito inferiores, tanto na saída da casa de vegetação, quanto na de sombra (25 e 27,8 %, respectivamente). Este resultado evidencia uma alta predisposição do clone ao enraizamento, porém determinada pelo tipo de propágulo usado.



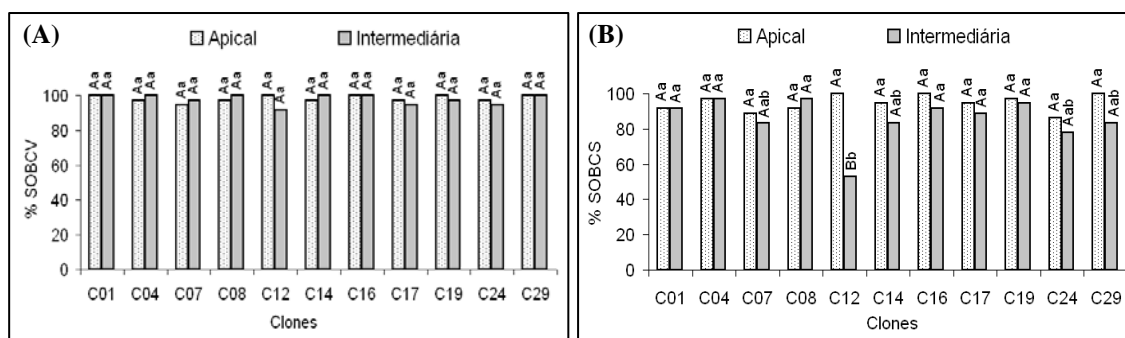


Figura 2 – Sobrevivência de miniestacas apicais e intermediárias na saída da casa de vegetação (SOBCV - A), aos 30 dias de idade, e na saída da casa de sombra (SOBCS – B), aos 40 dias de idade, de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C24 e C29) e *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (demais clones). Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula entre tipos de miniestacas dentro do mesmo clone e letras minúsculas entre clones dentro do mesmo tipo de miniestaca não diferem significativamente pelo teste Tukey, ao nível de 1 % de probabilidade de erro.

Foi observado que a emissão de raízes no fundo do tubete se iniciou a partir de 17 dias na casa de vegetação, sendo este resultado próximo ao encontrado por TITON et al. (2002) para miniestaquia de *Eucalyptus grandis*.

Ao analisar os resultados de enraizamento das miniestacas na saída da casa de sombra, aos 40 dias de idade (Figura 4A), notou-se que as miniestacas apicais apresentaram índices superiores de enraizamento na maioria dos clones, com valores variando entre 58,3 e 100 % entre clones. Nas miniestacas intermediárias, os índices de enraizamento variaram entre 25 e 86,1 % entre clones. No entanto, em cinco clones (C04, C07, C08, C16 e C19) não houve diferença estatística entre os tipos de miniestacas testados para porcentagem de enraizamento. Cinco clones apresentaram índices de enraizamento superiores a 90 % (C12, C14, C16, C19 e C29), quando se utilizou miniestacas apicais, e somente um clone (C01) apresentou índice de enraizamento inferior a 60 %. Estes resultados aqui obtidos confirmam as indicações de ALFENAS et al. (2004), os quais comentam que apenas de 1 a 2 % das árvores-elite selecionadas de *Eucalyptus globulus* apresentam enraizamento igual ou superior a 60 % e que a hibridação com outras espécies de *Eucalyptus* pode aumentar a facilidade de propagação vegetativa.

Em relação ao número de raízes por miniestaca enraizada, assim como nas demais características avaliadas, as miniestacas apicais apresentaram resultados superiores, variando entre 1,3 e 7,3 raízes por miniestacas, enquanto as miniestacas intermediárias apresentaram valores entre 1,2 e 2,6 raízes por miniestaca (Figura 4B). Ao comparar

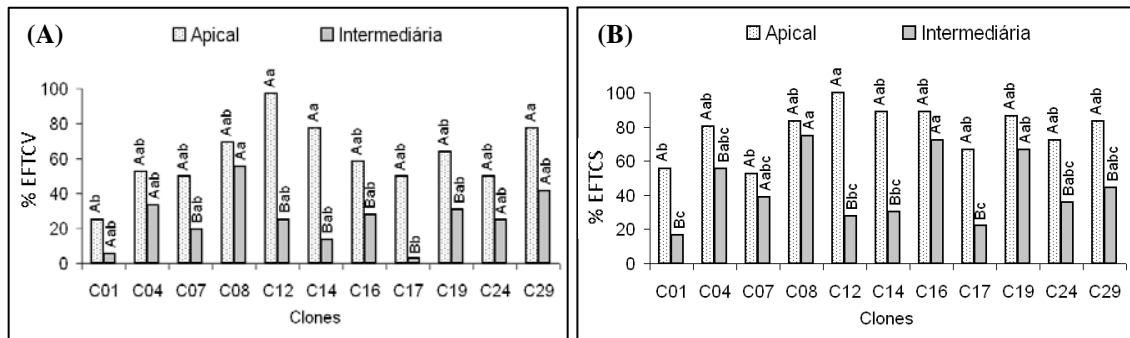


Figura 3 – Emissão de raízes no fundo do tubete de miniestacas apicais e intermediárias na saída da casa de vegetação (EFTCV - A), aos 30 dias de idade, e na saída da casa de sombra (EFTCS – B), aos 40 dias de idade, de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C24 e C29) e *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (demais clones). Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula entre tipos de miniestacas dentro do mesmo clone e letras minúsculas entre clones dentro do mesmo tipo de miniestaca não diferem significativamente pelo teste Tukey, ao nível de 1 % de probabilidade de erro.

clones, observou-se que o clone C12 (Figura 5), além de ter apresentado o maior índice de enraizamento, também apresentou o maior número de raízes por miniestaca apical (7,3). Por outro lado, o clone C01 (Figura 5) teve os valores mais baixos de número de raízes, tanto nas miniestacas apicais, quanto intermediárias (1,2 e 1,3, respectivamente). Estes resultados médios estão próximos aos obtidos por TITON et al. (2002), para enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*.

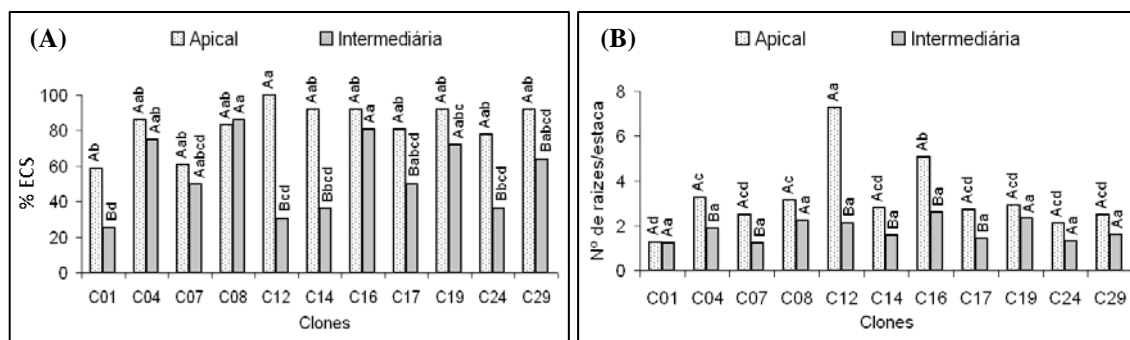


Figura 4 – Enraizamento (ECS - A) e número de raízes/miniestaca enraizada (B) de miniestacas apicais e intermediárias na saída da casa de sombra, aos 40 dias de idade, de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C24 e C29) e *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (demais clones). Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula entre tipos de miniestacas dentro do mesmo clone e letras minúsculas entre clones dentro do mesmo tipo de miniestaca não diferem significativamente pelo teste Tukey, ao nível de 1 % de probabilidade de erro.

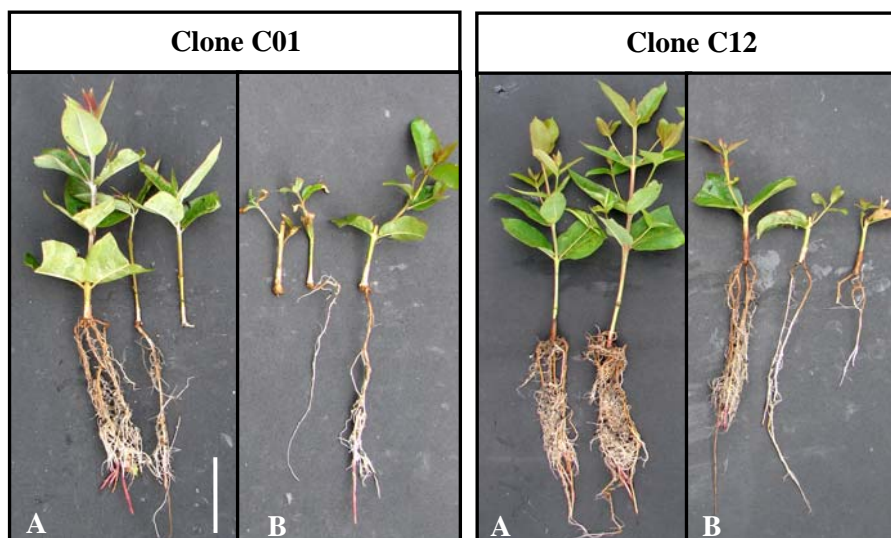


Figura 5 – Miniestacas apicais (A) e intermediárias (B) enraizadas dos clones C01 e C12 de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* na saída da casa de sombra, aos 40 dias de idade. Barra = 5 cm.

Os valores encontrados no presente estudo, para enraizamento, sobrevivência e número de raízes em miniestacas na saída da casa de sombra, estão de acordo com os obtidos por SCHWAMBACH et al. (2008) para um clone de *Eucalyptus globulus* x *maidenii*. Da mesma forma, alguns autores encontraram resultados semelhantes de enraizamento e sobrevivência de miniestacas ao trabalharem com outras espécies de *Eucalyptus* (WENDLING et al., 2000a; WENDLING et al., 2000b; XAVIER et al., 2001; SOUZA JUNIOR e WENDLING, 2003; ALMEIDA, 2006).

A habilidade dos tecidos das plantas para a formação de raízes adventícias depende de diferentes fatores endógenos e exógenos e da interação entre eles. No presente estudo, os resultados superiores de enraizamento obtidos para miniestacas apicais podem estar relacionados, dentre outros fatores, à menor lignificação dos tecidos desses propágulos, em relação às miniestacas intermediárias. Segundo XAVIER (2002), estacas herbáceas tem maior capacidade de formação de raízes, porém necessitam de maior controle das condições ambientais durante o enraizamento, para evitar a desidratação dos tecidos. Outro ponto pode estar relacionado ao fato das auxinas, substâncias fitorreguladoras que exercem papel crucial no enraizamento adventício (HARTMANN et al., 2002), serem produzidas principalmente em regiões de crescimento ativo como primórdios foliares e folhas jovens (RAVEN et al., 2007), fazendo com que miniestacas apicais tivessem maiores níveis endógenos desse fitorregulador.

No presente estudo não foi observado efeito do AIB, demonstrando ser desnecessária sua aplicação para alguns clones, o que resulta em economia no processo de produção de mudas. De forma semelhante, alguns autores também não encontraram efeito do AIB sobre o enraizamento e sobrevivência de miniestacas de *Eucalyptus* (XAVIER et al., 2001; SOUZA JUNIOR e WENDLING, 2003; WENDLING e XAVIER, 2005). Por outro lado, WENDLING et al. (2000b), GOULART (2007) e BRONDANI (2008) encontraram resultados positivos da aplicação de AIB em miniestacas de *Eucalyptus*. Estes autores notaram que havia um efeito positivo até uma determinada dose, a partir da qual houve toxidez para alguns clones. Da mesma forma, ALMEIDA (2006) obteve resultados positivos da aplicação de AIB, com as melhores doses variando entre clones de *Eucalyptus cloeziana*, espécie considerada de difícil enraizamento (ALFENAS et al., 2004).

Os bons percentuais de enraizamento obtidos para alguns clones com miniestacas apicais evidenciam o potencial da miniestaquia como técnica de propagação clonal dos híbridos de *Eucalyptus globulus*, gerando mudas com satisfatório padrão de qualidade (Figura 6). Por outro lado, alguns clones necessitam de melhores ajustes no processo de propagação para que índices satisfatórios de enraizamento possam ser obtidos. Nesse caso, o uso de técnicas como a micropropagação aliada a microestaquia, visando o rejuvenescimento clonal (TITON et al., 2006), podem ser promissoras para aumentar os índices e a qualidade do enraizamento desses clones.



Figura 6 – Miniestaca apical enraizada do clone C16 de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*, na saída da casa de sombra, aos 40 dias de idade. Barra = 5 cm.

#### 4. CONCLUSÕES

Considerando as condições experimentais, e com base nos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

- O regulador de crescimento AIB não apresentou efeito significativo em relação às características avaliadas para os clones e tipos de estacas estudados;
- As miniestacas apicais, de forma geral foram superiores às intermediárias em todas as características estudadas, indicando uma maior predisposição ao enraizamento;
- Foi observado entre os clones estudados alta variabilidade de resposta ao enraizamento, com clones apresentando alto índice de enraizamento, enquanto outros ainda carecem de ajustes no processo de propagação por miniestaquia.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. 442 p.

ALMEIDA, F. D. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. por estaquia e miniestaquia**. 2006. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotechnology florestal**. Viçosa: Suprema, 2007. p. 93-121.

ASSIS, T. F.; FETT-NETO, A. G.; ALFENAS, A. C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. In: WALTER, C.; CARSON, M. (Eds.). **Plantation forest biotechnology for the 21<sup>th</sup> century**. Kerala, India: Research Signposts, 2004. p. 303-333.

ASSIS, T. F.; ROSA, O. P.; GONÇALVES, S. I. Propagação por microestaquia. In: Congresso Florestal Estadual, 7, 1992, Nova Prata. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 1992. p. 824-836.

BRONDANI, G. E. **Miniestaquia e micropropagação de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2008. 118 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CARDOSO, G. V. **Otimização do cozimento kraft para produção de celulose a partir de madeiras de *Eucalyptus globulus* com diferentes teores de lignina**. 2002. 147 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

DEL PONTE, E. M.; MATTEI, V. L.; PETERS, J. A.; ASSIS, T. F. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus* Labill. **Revista Árvore**, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2001.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. **In:** 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, Julho de 2000. p. 255-258.

GOULART, P. B. **Influência do acondicionamento, antioxidantes, auxinas e seus cofatores no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.** 2007. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices.** 7. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880 p.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e sua evolução no Brasil.** Piracicaba: IPEF/ESALQ/USP, 2000. 10 p. (Circular Técnica, 192).

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal.** 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 830 p. (Tradução).

ROSA, C. A. B.. **Influência do teor de lignina da madeira de *Eucalyptus globulus* na produção e na qualidade da celulose Kraft.** 2003. 140 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

SCHWAMBACH, J.; RUEDELL, C. M.; ALMEIDA, M. R.; PENCHEL, R. M.; ARAÚJO, E. F.; FETT-NETO, A. G. Adventitious rooting of *Eucalyptus globulus* x *maidennii* mini-cuttings derived from mini-stumps grown in sand bed and intermittent flooding trays: a comparative study. **New Forests**, v. 36, p. 261-271, 2008.

SOUZA JUNIOR, L.; WENDLING, I. Propagação vegetativa de *Eucalyptus dunnii* via miniestaquia de material juvenil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 46, p. 21-30, 2003.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Clonal propagation of *Eucalyptus grandis* using the mini-cutting and micro-cutting techniques. **Scientia Forestalis**, n. 71, p. 109-117, 2006.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Dinâmica de enraizamento de microestacas e miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 26, n. 6. p. 665-673, 2002.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência do ácido indolbutírico e da miniestaquia seriada no enraizamento e vigor de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, p. 921-930, 2005.

WENDLING, I.; XAVIER, A.; GOMES, J. M.; PIRES, I. E.; ANDRADE, H. B. Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. **Revista Árvore**, v. 24, n. 2, p. 181-186, 2000a.

WENDLING, I.; XAVIER, A.; GOMES, J. M.; PIRES, I. E.; ANDRADE, H. B. Efeito do regulador de crescimento AIB na propagação de clones de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. **Revista Árvore**, v. 24, n. 2, p. 187-192, 2000b.

WENDLING, I. **Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia.** 1999. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

XAVIER, A. **Silvicultura clonal I: princípios e técnicas de propagação vegetativa.** Viçosa: UFV, 2002. 64p. (Caderno Didático, 92).

XAVIER, A.; ANDRADE, H. B.; OLIVEIRA, M. L.; WENDLING, I. Desempenho do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 25, n. 4, p. 403-411, 2001.

XAVIER, A.; WENDLING, I. **Miniestaquia na clonagem de *Eucalyptus*.** Viçosa: SIF, 1998. 10 p. (Informativo Técnico SIF, 11).

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996.

XAVIER, A. A.; SANFUENTES, E. V.; JUNGHANS, D. T.; ALFENAS, A. C. Resistência de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens* à ferrugem (*Puccinia psidii*). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 731-735, 2007.

### 3. CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos e nas condições em que foram realizados os experimentos, conclui-se que:

- 1) Na fase de estabelecimento *in vitro* dos clones híbridos de *Eucalyptus globulus* a contaminação por bactérias foi alta e a contaminação por fungos e a oxidação foram relativamente baixas na maioria dos clones, não comprometendo o estabelecimento das culturas. A resposta entre clones e introduções *in vitro* foi diversificada e, de modo geral, a indução de brotações axilares foi satisfatória.
- 2) Na fase de multiplicação *in vitro*, os meios de cultura MS e JADS tiveram efeitos positivos na taxa de multiplicação, com tendência de melhores resultados para o meio MS na segunda e terceira introdução *in vitro*. Houve respostas diferenciadas quanto à taxa de multiplicação, com clones apresentando boa proliferação de gemas axilares e alguns clones recalcitrantes à micropropagação.
- 3) Quanto ao enraizamento de miniestacas dos clones híbridos de *Eucalyptus globulus*, não foi observado efeito do AIB sobre as características avaliadas. Houve resposta diferenciada dos genótipos estudados, com clones apresentando altas taxas de enraizamento e clones de difícil propagação, sendo que as miniestacas apicais apresentaram resultados superiores.

De modo geral, as técnicas de propagação utilizadas no presente estudo para os híbridos de *Eucalyptus globulus* foram promissoras, porém maiores estudos buscando ajustes no processo de micropropagação, assim como estudos para aumentar as taxas e a qualidade do enraizamento de miniestacas dos clones de difícil propagação, são necessários para implementar a propagação clonal desses híbridos.